Aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie
der Kinderklinik der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer

ZUR GRANULOZYTENFUNKTION BEI MUCOVISCIDOSE

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
HELMUT HORST KACHLER
aus Ludwigsburg

1986

Aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie
der Kinderklinik der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer

ZUR GRANULOZYTENFUNKTION BEI MUCOVISCIDOSE

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
HELMUT HORST KACHLER
aus Ludwigsburg

1986

Dekan: Professor Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Niethammer
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. R. Nolte

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Mucoviscidose	3
2.1.	Das Krankheitsbild der Mucoviscidose	3
2.2.	Bakterielle Infektionen bei Mucoviscidose	4
2.2.1.	Pathologische Veränderungen der Lunge bei c.f.	5
2.2.2.	Das Erregerspektrum in c.f.-Bronchopneumonien	5
2.2.3.	Hypothesen zum Erregerspektrum bei Mucoviscidose	7
3.	Allgemeines zur Granulozytenfunktion	9
4.	Beschreibung der Patienten und der Methoden	11
4.1.	Patienten	11
4.2.	Methoden der Granulozytenfunktionsprüfung in vitro	15
4.2.1.	Herstellung einer Granulozytensuspension	15
4.2.2.	Intrazelluläre Abtötung von Staphylokokkus aureus bzw. Pseudomonas aeruginosa	16
4.2.3.	Stimulierter Nitroblautetrazoliumtest	19
4.2.4.	Chemilumineszenztest	21
4.2.5.	Chemotaxis der Granulozyten	23
4.2.6.	Bestimmung der Complementfaktoren C_3 und C_4, der Complementaktivität C_{H50} und Bestimmung der Immunglobuline IgG, IgM und IgA	25
5.	Ergebnisse der Untersuchungen zur Granulozytenfunktion bei Mucoviscidose	26
6.	Diskussion	36
6.1.	In vitro-Abtötung von Staphylokokkus aureus und Pseudomonas aeruginosa	36
6.2.	Der stimulierte NBT-Test	38
6.3.	Chemilumineszenzuntersuchungen	39
6.4.	Chemotaxis	41
6.4.1.	Begleitfaktoren, die zu einer veränderten Chemotaxis führen können	42

Seite

6.5. Theoretische Überlegungen zu den möglichen Auswirkungen einer defekten Chemotaxis 49

6.6. Die entzündliche Reaktion in der Lunge und die Rolle von Granulozyten und Alveolarmakrophagen 49

6.7. Intrapulmonale Faktoren bei Mucoviscidose und deren mögliche Auswirkungen auf die Chemotaxis der Granulozyten 53

7. Zusammenfassung 56

8. Literaturverzeichnis 58

1. EINLEITUNG

Bei der Diagnostik und Oberwachung der verschiedensten Krankheiten spielt das Differentialblutbild eine wichtige Rolle. Die absolute Leukozytenzahl, sowie die relative Verteilung der einzelnen Zellarten geben wertvolle Hinweise auf pathologische Veränderungen. Besonders deutlich werden entzündliche Prozesse durch eine Vermehrung der weißen Blutzellen angezeigt. Darin zeigt sich schon die Bedeutung dieser Zellen bei der Abwehr von pathogenen Keimen. Bei der weiteren Differenzierung ergibt sich, daß gegen virale Krankheitserreger die zellulären und humoralen Anteile des Immunsystems wirksam sind und daß für die Abwehr von Pilzen und Bakterien vor allem die phagozytierenden Zellen des Blutes zuständig sind. Zu den phagozytierenden Zellen gehören eosinophile und neutrophile Granulozyten, sowie Monozyten und Makrophagen. Der Anstieg der Granulozytenzahl im pheripheren Blut und ihre Ansammlung im Eiter während einer bakteriellen Entzündung, sowie die Infektanfälligkeit bei angeborenen oder erworbenen Neutropenien und Agranulozytosen machen die Notwendigkeit dieser Zellen für die Infektabwehr deutlich.
Erst in neuerer Zeit wurde klar, daß nicht nur das Vorhandensein von phagozytierenden Zellen, sondern auch deren ausreichende Funktionsfähigkeit zur Infektabwehr nötig sind.
Nachdem dies erstmals beim Krankheitsbild der Septischen Granulomatose erkannt wurde (25) fand man eine ganze Reihe von Krankheiten, bei denen angeborene oder erworbene Defekte der Granulozytenfunktion von Bedeutung sind (45, 46).
Gemeinsam findet sich bei allen diesen Erkrankungen ein gehäuftes Auftreten von schweren bakteriellen Infektionen, bei meist unauffälligem Differentialblutbild. Auch die Morphologie der Leukozyten bietet keine Erklärung für die erhöhte Infektanfälligkeit. Erst die Prüfung der Granulozytenfunktion verdeutlicht, daß die Ursache dieser Krankheiten in einer Störung einzelner Teilschritt der bakteriellen Abwehr zu suchen ist.
Das Krankheitsbild der Mucoviscidose zeichnet sich unter anderem ebenfalls durch häufige und schwere Infektionen aus.

Fast immer handelt es sich um Bronchitiden und Pneumonien, an denen Pseudomonas aeruginosa und Staphylokokkus aureus beteiligt sind. Im Gegensatz dazu werden diese beiden Keime im normalen Krankengut nur sehr selten als Infektionsverursacher gefunden. Die Mechanismen der Infektionen, die bei Mucoviscidose zu diesem eigentümlichen Keimspektrum führen, sind trotz vieler Bemühungen nicht vollständig aufgeklärt.

Eine der möglichen Ursachen für die erhöhte Infektanfälligkeit könnte auch eine Störung der Granulozytenfunktion sein.

Denkbar wäre ein allgemeiner Defekt in einem der Teilschritte der Granulozytenfunktion oder aber eine spezifische Abwehrschwäche gegen die häufig nachweisbaren Keime Staphylokokkus aureus oder Pseudomonas aeruginosa.

Unter dieser Fragestellung wurden für die vorliegende Arbeit verschiedene Funktionsteste mit Granulozyten von mucoviscidosekranken Kindern und Jugendlichen durchgeführt.

2. MUCOVISCIDOSE

2.1. DAS KRANKHEITSBILD DER MUCOVISCIDOSE

Die Mucoviscidose ist eine Erbkrankheit, die sich bei den Erkrankten an verschiedenen Organen manifestiert.
Die wichtigsten Veränderungen sind:

1. rezidivierende und chronische Bronchitiden
2. exokrine Pankreasinsuffizienz
3. erhöhte Elektrolytkonzentration im Schweiß.

Während die veränderte Schweißsekretion erst in den 5o-er Jahren entdeckt wurde (13), waren die Veränderungen an der Lunge und am Verdauungstrakt schon sehr viel früher aufgefallen und beschrieben worden. Aber erst 1936 wurden diese Symptome von FANCONI, UEHLINGER und KNAUER zu einem Syndrom zusammengefaßt und unter dem Titel "Das Zoeliakiesyndrom bei angeborener Zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasen" veröffentlicht (14). Die Bezeichnung "Mucoviscidosis" wurde erst später von FARBER (15) eingeführt, der die Ursache der Krankheit in einer Eindickung der schleimproduzierenden Drüsen sah. Während im deutschen Schrifttum weitgehend der Name "Mucoviscidose" verwendet wird, hat sich im englisc sprachigen Raum die Bezeichnung "cystic fibrosis" eingebürgert.*
Die Mucoviscidose ist eine der häufigsten angeborenen Stoffwechselkrankheiten. Sie wird autosomal-rezessiv vererbt, wobei die Genlokalisation und der zugrundeliegende Stoffwechseldefekt noch nicht geklärt sind.
Die Häufigkeit der homozygoten Merkmalsträger wird für die mitteleuropäische Bevölkerung mit ca. 1:2000 angegeben (63).
Die pathophysiologischen Veränderungen der Mucoviscidose sind Folge der Funktionsstörung eines Teils der exokrinen Drüsen, nämlich der mucösen Drüsen. Diese sondern ein hochvisköses, eiweißreiches Sekret ab, das die Ausführungsgänge der Drüsen verstopft und sekundär zu fibrotischer

*in dieser Arbeit werden beide Begriffe synonym verwendet, wobei "cystic fibrosis" auch mit "c.f." abgekürzt wird.

Umwandlung und zystischer Degeneration der Drüsen führt.
Dieser Vorgang führt auch im Pankreas zum Untergang der exokrinen Drüsen und nachfolgend zu einem Mangel an lipolytischen und proteolytischen Enzymen. Während die Pankreasveränderungen erst postnatal beginnen, findet sich häufig schon beim Neugeborenen ein Meconiumileus als erster Hinweis auf eine Mucoviscidose.
Am folgenschwersten sind die Veränderungen in der Lunge, wo die zystische Degeneration zu Bronchiektasen, die erhöhte Viskosität des Schleims zu Obstruktion führt, und beides zusammen den Beginn einer chronischen Infektion begünstigt.
Auch in den Nasennebenhöhlen, den Speicheldrüsen, in den Gallengängen, an der Cervix uteri oder in den Samenbläschen können die beschriebenen Veränderungen auftreten, sind dort aber von untergeordneter klinischer Bedeutung.
Das Hauptproblem bei der Therapie der Mucoviscidose sind die chronischen Bronchitiden und die damit verbundenen Lungenveränderungen, während die exkretorische Pankreasinsuffizienz durch Enzymsubstitution relativ gut zu behandeln ist.
Die erhöhte NaCl-Konzentration im Schweiß hat keinen eigentlichen Krankheitswert, dient aber als wichtiger Anhaltspunkt bei der Diagnose der Mucoviscidose.

22. BAKTERIELLE INFEKTIONEN BEI MUCOVISCIDOSE

Schon den Erstbeschreibern des neuentdeckten Krankheitsbildes Mucoviscidose war die enge Verknüpfung dieser Krankheit mit bakteriellen Infektionen aufgefallen (1).
Auch heute noch, fast 5o Jahre nach Entdeckung der Krankheit, ist die Therapie der bakteriellen Infektionen die Hauptschwierigkeit und bestimmt wesentlich den Verlauf der Krankheit und die Lebenserwartung der erkrankten Kinder.
Die bakteriellen Infektionen bei Mucoviscidose sind streng auf die Lunge beschränkt. Befall anderer Organe oder Septicämien werden sehr selten gefunden (33, 41).

2.2.1. PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER LUNGE BEI C.F.

Wie man bei an Meconiumileus verstorbenen Neugeborenen sieht, ist die Lunge bei Geburt morphologisch noch normal. Erste Zeichen einer Lungenveränderung sind Dilatation und Hypertrophie schleimbildender Drüsen durch Produktion eines Schleimes mit erhöhter Viskosität. Die Verstopfung der Ausführungsgänge führt zu zystischer Degeneration der Drüsenschläuche und zu Metaplasie des Bronchialepithels. Die weiteren pathologischen Veränderungen stehen in engem Zusammenhang mit bakterieller Besiedelung und den damit verbundenen toxischen und entzündlichen Prozessen.
Den Anfang der meist chronisch-progredienten Infektion bildet in der Regel eine Bronchiolitis mit nachfolgender Einbeziehung größerer Luftwege. Die vermehrte Schleimproduktion bei Mucoviscidose und die durch Entzündung verursachte vermehrte Exsudation führen zu einem verhängnisvollen Kreislauf aus Obstruktion, vermehrtem Gewebeschaden, Bronchiektasen, Weiterbestehen der Infektion, peribronchiale Fibrose, Atelektasen durch verminderte Luftzufuhr, und somit zu einem fortschreitenden Verlust der Lungenfunktion (34, 48, 63).

2.2.2. DAS ERREGERSPEKTRUM IN C.F.-BRONCHOPNEUMONIEN

Ganz besonders auffällig bei c.f.-Bronchopneumonien ist das Spektrum der beteiligten Krankheitserreger, das sich so bei kaum einer anderen Krankheit findet. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht von Arbeiten zu diesem Thema.

Tab. 1: Das Erregerspektrum der Bronchopneumonien bei Mucoviscidose.
Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der gefundenen Bakterien wieder.
Die angeführten Untersuchungen wurden an Sputum oder tiefen Rachenabstrichen durchgeführt.

AUTOR	ZAHL DER PATIENTEN	STAPH. AUREUS	PSEUDO-MONAS	HÄMOPHIL. INLFUENZA	DIPL. PNEUM.	ANDERE
DICKEY (12) 1950	10	70	10	-	-	20
HUANG (26) 1961	50 (1950-58)	55	50	2	2	21
	30 (1958-59)	63	55	2	5	10
	28 (1959-60)	65	52	1	2	27
IACOCCA (29) 1963	34	85	65	21	3	15
FEIGELSON (16) 1967	19	65	57	1	-	44
HØIBY (23) 1974	70	39	44	17	5	6
REYNOLDS (51) 1975	58	52	72	7	-	16
KULCZYCKI (33) 1978	134	88	78	43	38	78

Wie man an den verschiedenen, unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen sieht, überwiegen bei c.f.-Bronchopneumonien Erreger, nämlich Staphylokokkus aureus und Pseudomonas aeruginosa, die im allgemeinen als

ubiquitär vorkommende, aber wenig pathogene Keime beschrieben werden (30).
Besonders Infektionen mit Pseudomonas aeruginosa stellen im normalen Krankengut eine Seltenheit dar. So fand BENNETT (3) bei 90.000 in Behandlung stehenden Patienten mit den verschiedensten Krankheiten eine Pseudomonasinfektionsrate von nur 0,7%. WOOD (62) fand bei 35.000 nicht-mucoviscidosekranken Kindern einer pädiatrischen Klinik lediglich 130-mal (0,4%) Pseudomonas als Infektionsursache.
Insbesondere Pseudomonasbronchitiden sind therapeutisch schwer zugänglich und bestimmen den weiteren Verlauf der Krankheit.
In einer Untersuchung von MEARNS et al. (42) korrelierte das Auftreten von Pseudomonas mit dem Schweregrad klinischer Veränderungen.
Auch die Tatsache, daß sich das Verhältnis Staphylokokkus aureus/Pseudomonas aeruginosa bei Abstrichen um den Todeszeitpunkt zugunsten von Pseudomonas verändert, spricht für eine höhere "Malignität" von Pseudomonas bei Mucoviscidose (40).
Bei chronischen Infektionen bildet Pseudomonas aeruginosa häufig eine mucöse Kapsel, die zum einen den ohnehin schon zähen Schleim noch visköser macht, zum anderen auch die Antibiotikatoleranz erhöht (19, 52).
Die Umwandlung in mucoide Formen ist streng an einen c.f.-kranken Wirt gebunden und wird in vitro schon nach kurzer Zeit wieder rückgängig gemacht (48).
Weder für das Auftreten von mucoid-Formen, noch für das außergewöhnliche Erregerspektrum bei Mucoviscidose gibt es derzeit eine schlüssige Erklärung.

2.2.3. HYPOTHESEN ZUM ERREGERSPEKTRUM BEI MUCOVISCIDOSE

1. Der Gebrauch von Antibiotika schafft für die resistenteren Keime wie Staphylococcus aureus oder Pseudomonas aeruginosa einen Selektionsvorteil.
2. Durch häufigen Klinikaufenthalt, durch Gebrauch von Verneblergeräten bei der Atemtherapie kommen Mucoviscidosepatienten vermehrt in Kontakt mit resistenten Hospitalkeimen.

3. Endogene Faktoren, wie vermehrte Schleimbildung, verminderter mucociliarer Transport, höhere Elektrolytkonzentration in Sekreten und andere lokale oder systemische Faktoren begünstigen das Wachstum von Staphylokokkus aureus und Pseudomonas aeruginosa. Auch ein etwaiger Defekt im Abwehrsystem gegenüber diesen Erregern würde zu dieser Hypothese gehören.

Weder die langdauernde Antibiotikatherapie, noch die häufigen Krankenhausaufenthalte sind für sich genommen eine ausreichende Erklärung. Auch andere Patienten, z.B. solche mit chronischer Bronchitis anderer Ätiologie als c.f. werden häufig unter ähnlichen Bedingungen behandelt und entwickeln trotzdem nicht diese Prävalenz für Staphylokokkus aureus oder Pseudomonas aeruginosa (35). Demgegenüber haben viele Kinder bei der Erstdiagnose von Mucoviscidose, d.h. ohne langdauernde Krankengeschichte, schon vermehrt diese Keime im Sputum (42).
Natürlich haben exogene Faktoren wie Antibiotikabehandlung oder Hospitalisierung auch bei c.f.-Patienten wesentlichen Einfluß auf Infektionsverlauf und Resistenzentwicklung, aber ohne die Annahme von zusätzlichen endogenen Faktoren läßt sich die Prädisposition zu Staphylokokken- und Pseudomonasinfekten nicht erklären.
Solch ein möglicher endogener Faktor könnte auch eine Störung der bakteriellen Abwehr bei Mucoviscidose sein. Diese Arbeitshypothese wird auch durch folgende Beobachtung bestärkt:
Patienten mit Neutropenien verschiedenster Genese, Patienten die mit Immunsuppressiva behandelt werden, oder Brandverletzte bei denen auch eine Schwächung der Immunabwehr nachgewiesen werden kann, leiden ebenfalls häufig unter Infektionen mit Pseudomonas, wenn auch die typische Lokalisation bei diesen Patienten fehlt.
Aufgrund dieser Beobachtungen wurde für die vorliegende Arbeit die Granulozytenfunktion bei Mucoviscidose untersucht.

3. ALLGEMEINES ZUR GRANULOZYTENFUNKTION

Wie schon in Kapitel 1 erwähnt wurde, sind die Granulozyten ein Teil der komplizierten Abwehrkette, die es dem menschlichen Körper ermöglicht,körperfremde und krankmachende Mikroorganismen zu erkennen und unschädlich zu machen. Die Granulozyten werden zu den phagozytierenden Zellen gerechnet, deren Aufgabe die Bekämpfung von Pilzen und Bakterien ist. Die Bezeichnung als "phagozytierende Zellen" weist schon auf eine wichtige Fähigkeit dieser Zellen hin.

Ursprünglich wurde unter Phagozytose der gesamte Vorgang der Abtötung von Pilzen und Bakterien verstanden. Erst genauere Untersuchungen der Granulozytenfunktion machten deutlich, daß dieser Vorgang aus mehreren aufeinanderfolgenden Teilschritten besteht. Jedem dieser Einzelschritte liegen wiederum Mechanismen zugrunde, die durch Zellorganellen auf enzymatischem Wege oder unter Beteiligung verschiedener Ionen vermittelt wird.
Minderleistungen oder Ausfälle sind auf allen den genannten Ebenen möglich und können zur Störung der gesamten Granulozytenfunktion führen. In der Tat wurden schon mehrere Krankheiten beschrieben, bei denen solche Funktionsstörungen zu erhöhter Infektionsanfälligkeit führen (45, 46).
Der Vorgang der Abtötung von Pilzen und Bakterien läßt sich grob in folgende Teilschritte gliedern:

CHEMOTAXIS ist die Fähigkeit des Granulozyten zur gerichteten Migration. In das Gewebe eingedrungene Bakterien setzen Substanzen frei, die zusammen mit aus dem Gewebe selbst abgegebenen Stoffen einen chemotaktischen Reiz auf Granulozyten und Monozyten ausüben. Neben löslichen bakteriellen Faktoren und Produkten aus antigenstimulierten Lymphozyten spielt dabei auch die Aktivierung des Komplementsystems eine wichtige Rolle. Die Zelle selbst reagiert auf diese Stimulation mit aktiver Bewegung in Richtung des chemotaktischen Reizes. Die Gefäßpermeation und die Anreicherung im Entzündungsgebiet beruhen auf den geschilderten Mechanismen und sind wichtige Voraussetzung für eine wirkungsvolle Abwehr.

An der OPSONIERUNG sind verschiedene Serumfaktoren, wie das Komplementsystem und Immunglobuline beteiligt. Dieser Vorgang dient dazu, die Krankheitserreger für die nachfolgende Phagozytose vorzubereiten, indem diese an die Granulozytenmembran fixiert werden.

Bei der PHAGOZYTOSE werden die Bakterien durch eine Verformung der Granulozytenmembran umschlossen und in die Zelle aufgenommen. Die dadurch entstandenen Vesikel werden als Phagosomen bezeichnet.

In der Phase der DEGRANULIERUNG entleeren sich mit antibakteriellen Substanzen und hydrolytischen Enzymen gefüllte Granula in die Phagosomen.
Die Phagozytose führt in den zuvor relativ inaktiven Granulozyten zu einer drastischen Steigerung verschiedener enzymatisch gesteuerter Stoffwechselprozesse. Es kommt zur Aktivierung des Hexose-Monophosphat-Shunts, einem erhöhten Sauerstoffverbrauch ("respiratory burst") und zur Produktion von bakteriziden, oxidierenden Substanzen.

Erst wenn jeder einzelne, der hier nur andeutungsweise beschriebenen Teilschritte funktioniert, ist die Abwehr gegen Pilze und Bakterien gewährleistet. Defekte oder Minderleistungen können sowohl bei den Zellen selbst, als auch im Zusammenspiel mit extrazellulären Serumfaktoren liegen.

4. BESCHREIBUNG DER PATIENTEN UND DER METHODEN

4.1. PATIENTEN

Die Untersuchung der Granulozytenfunktion bei Mucoviscidose wurde an 22 Kindern und Jugendlichen durchgeführt, bei denen diese Diagnose durch mehrfach positive Schweißteste, sowie durch den klinischen Verlauf eindeutig gesichert ist. Die meisten der Patienten kamen zur ambulanten Betreuung in die Poliklinik der Universitäts-Kinderklinik Tübingen, nur 2 Patienten wurden stationär behandelt.
Mit Einverständnis der Eltern, bzw. der Patienten selbst, wurden ca. 1o ml Venenblut abgenommen. In fast allen Fällen konnten diese Proben anläßlich der routinemäßigen Blutabnahmen gewonnen werden, so daß keine zusätzliche Venenpunktion notwendig war. Bei Kleinkindern und Patienten in sehr schlechter körperlicher Verfassung wurde wegen der zusätzlichen Belastung auf eine Blutprobe verzichtet.

ALTER DER PATIENTEN

Das mittlere Alter der untersuchten Patienten lag bei 15,3 $\pm$ 3,8 Jahren ($\bar{x} \pm$ Standardabweichung). Die Alterspanne reichte von 7 bis zu 24 Jahren.

GESCHLECHTSVERTEILUNG

Die Untersuchungen wurden an 14 Jungen und an 8 Mädchen durchgeführt.

GRÖßE UND GEWICHT DER PATIENTEN

Größe und Gewicht der Patienten wurden am Tag der Untersuchung gemessen und anschließend in Perzentilen umgerechnet. Dabei wurde eine Perzentilenkurve aus einer deutschen Querschnittuntersuchung von MAASER (36) verwendet.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2.: Die Größen- und Gewichtsperzentilen der untersuchten Patienten mit Mucoviscidose

GRÖßE:	7 Patienten waren ≤ der	3. Perzentile
	5 Patienten lagen zwischen der	3. und 10. Perzentile
	5 Patienten lagen zwischen der	20. und 30. Perzentile
	2 Patienten lagen bei der	50. Perzentile
	1 Patient lag bei der	90. Perzentile
	(siehe auch Abb. 1a)	
GEWICHT:	13 Patienten waren ≤ der	3. Perzentile
	3 Patienten lagen bei der	10. Perzentile
	3 Patienten lagen zwischen der	20. und 30. Perzentile
	2 Patienten lagen zwischen der	40. und 50. Perzentile
	1 Patient lag bei der	90. Perzentile
	(siehe auch Abb. 1b)	

Die untersuchten mucoviscidosekranken Kinder und Jugendlichen lagen also in der körperlichen Entwicklung deutlich unter der jeweiligen Altersnorm.

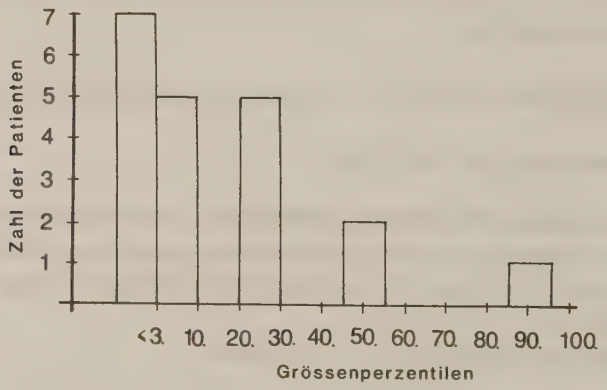

Abb. 1a: Darstellung der Körperlichen Entwicklung der Patienten mit Mucoviscidose nach Größenperzentilen

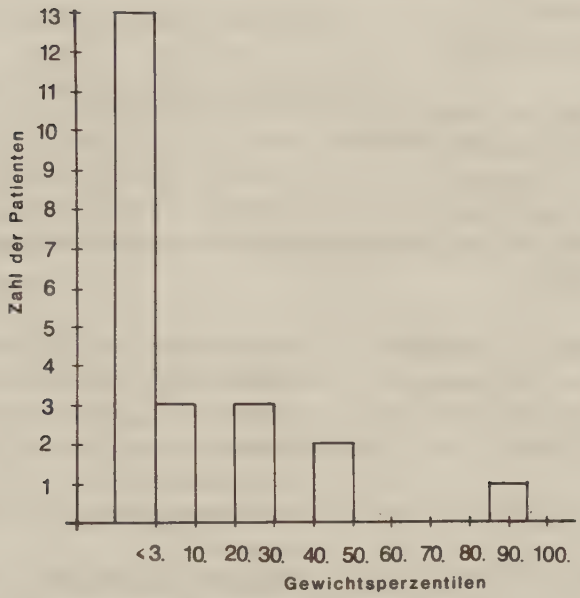

Abb. 1b: Darstellung der körperlichen Entwicklung der Patienten mit Mucoviscidose nach Gewichtsperzentilen.

INFEKTIONEN UND SPUTUMKULTUREN

6 der 22 Patienten zeigten klinisch leichte Infektionen der oberen Luftwege, also Husten, Schnupfen, subfebrile Temperaturen und zum Teil verstärkte Rasselgeräusche über der Lunge. Unter einer schweren, akuten Infektion litt keiner der untersuchten Patienten.
Bei 12 Patienten wurde das Sputum bakteriologisch untersucht. Die Kultur blieb bei 4 Patienten negativ, bzw. zeigte lediglich apathogene Rachenflora. Unter den positiven Kulturen fand sich:

1x Colibakterien
1x Klebsiella pneumoniae
1x Staphylokokkus aureus
1x Proteus mirabilis
4x Pseudomonas aeruginosa

Wie die Befunde der Sputumkulturen mit der klinischen Diagnose "Infekt" korrelieren zeigt Tabelle 3.

Tab. 3: Korrelation der Sputumbefunde mit der klinischen Diagnose "Infekt".

Patientennummer	Infekt	Sputumbefund
1	-	negativ
2	-	negativ
4	-	negativ
6	-	Coli-Bakterien
7	+	nicht durchgeführt
9	-	negativ
12	+	Klebsiella pneumoniae
13	+	Staphylokokkus aureus
14	+	Pseudomonas aeruginosa
17	+	Pseudomonas aeruginosa
18	-	Proteus mirabilis
21	+	Pseudomonas aeruginosa
22	-	Pseudomonas aeruginosa

In die Tabelle wurden nur die Patienten aufgenommen, bei denen die Diagnose "Infekt" gestellt und/oder eine Sputumkultur angelegt worden war.

BLUTSENKUNGSGESCHWINDIGKEIT (BSG)*

6 Patienten zeigten eine normale Blutsenkungsgeschwindigkeit (bis 10/20). Bei 8 Patienten war die BSG leicht beschleunigt (10/20 - 20/40). Als

Patienten mit deutlicher Senkungsbeschleunigung (bis 40/80) wurden 6 eingestuft, und 1 Patient lag mit 70/105 auch noch darüber. Bei einem Patienten war keine BSG durchgeführt worden.
(* Alle Angaben in mm/1 h und mm/2 h).

LEUKOZYTENZAHL UND DIFFERENTIALBLUTBILD

Diese Untersuchung wurde an 20 der 22 Patienten durchgeführt. Bei mehr als der Hälfte der Patienten lag die Leukozytenzahl im Bereich der Norm (5.000 - 10.000). Eine leichte Leukozytose wiesen 8 Patienten auf (10.000 - 15.000), 1 Patient hatte eine leichte Leukopenie (3.250).

Im Differentialblutbild fand sich bei 5 Patienten eine Linksverschiebung und/oder eine Granulozytose. Diese waren definiert als über 5% stabkernige Granulozyten, bzw. mehr als 75% Granulozyten. Der Rest der Patienten zeigte ein unauffälliges Differentialblutbild.

ANDERE ZUSÄTZLICHE ERKRANKUNGEN ZUM ZEITPUNKT DER UNTERSUCHUNG

Zusätzlich zur Mucoviscidose litt ein Patient unter einem Diabetes mellitus. Bei einem anderen Patienten war eine Purpura Schönlein-Henoch diagnostiziert worden.

4.2. METHODEN DER GRANULOZYTENFUNKTIONSPROFUNG IN VITRO

4.2.1. HERSTELLUNG EINER GRANULOZYTENSUSPENSION

Materialien:

Soweit nicht anders angegeben, sind alle Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt.

10 ml Einmalspritze, silikonisierte Glasröhrchen, sterile Pipetten, Neubauer-Zählkammer.
Mikroskop, Kühlzentrifuge (4°C), Brutschrank (37°C),
Vetren 200^{R}, Promota, Heidelberg,

Dextranlösung Macrodex^{R}, 6%, Knoll AG, Ludwigshafen,
TC Hanks Solution, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

Methode:

- Heparinisiertes Vollblut (10 I.E. Heparin/ml) wird mit Macrodex^{R} im Verhältnis 1:10 vermischt.
- Sedimentation des Blutes in der Spritze bei 37°C, bis sich die Erythrozyten auf die Hälfte des Gesamtvolumens abgesetzt haben (ca. 30 min).
- der Oberstand wird vorsichtig in ein silikonisiertes Glasrohr abgespritzt. Damit die Spritze nicht gedreht werden muß, (oben: Plasma mit Granulozyten, unten: Erythrozytensediment), wird eine gebogene Kanüle aufgesetzt. Dadurch kann die Spritze in aufrechter Position bis zum Beginn des Erythrozytensediments entleert werden.
- Zentrifugation bei 400 g (20 sec).
- Oberstand abgießen - wird nach nochmaliger Zentrifugation als Plasma verwendet.
- Sediment in 5 ml TC Hanks Solution aufnehmen
- bei 250 g zweimal abzentrifugieren (je 8 min)
- Zahl der Granulozyten unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer auf 1 x 10^{7}/ml einstellen, indem diese in einer entsprechenden Menge TC Hanks-Lösung suspendiert werden.

Diese Granulozytensuspension dient als Ausgangsmaterial für alle folgenden Versuche.

4.2.2. INTRAZELLULÄRE ABTÖTUNG VON STAPHYLOKOKKUS AUREUS BZW. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Materialien:

Sterile Plastikröhrchen, sterile Glaspipetten, TC Hanks Solution, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA,
physiologische Kochsalzlösung, steril,

Blutagarplatten, Fa. Heipha, Heidelberg,
Photometer, Schüttelwasserbad (37°C), Brutschrank (37°C, 5% CO_2)
Kultur von Staphylokokkus aureus,
Kultur von Pseudomonas aeruginosa (Typ ATCC 27853).

Methode: nach MANDELL et al. (38)

Der Versuch der intrazellulären Bakterienabtötung wurde mit zwei verschiedenen Keimen in getrennten Ansätzen durchgeführt. Vorbereitung, Durchführung und Auswertung des Versuches waren jedoch für beide Bakterienarten identisch.

Vorbereitung:

24 Stunden vor Versuchsbeginn werden Staphylokokkus aureus bzw. Pseudomonas aeruginosa auf Agarplatten angezüchtet.

- Am Versuchstag wird die Keimzahl in einer NaCl-Lösung mit Hilfe eines Photometers auf ca. 1 x 10^7/ml eingestellt (95% Transmission bei 650 nm). Anschließend Verdünnung auf 1 x 10^6 Bakterien/ml physiologische NaCl-Lösung.
- Von der ursprünglichen Granulozytensuspension werden 0,2 ml zu 0,5 ml Hanks-Lösung gegeben, d.h. auf 4 x 10^6/ml verdünnt.
- Autologes Serum wird durch Zentrifugation von geronnenem Vollblut des Patienten gewonnen. Als Kontrollserum wird Serum von mehreren gesunden Spendern aus der Blutbank der Universität Tübingen verwendet (pool-Serum).

Durchführung:

In sterile Plastikröhrchen wird gegeben:

Nr. 1: 0,25 ml Granulozytensuspension
0,2 ml autologes Serum
0,35 ml Hanks-Lösung

Nr. 2: 0,25 ml Granulozytensuspension
0,2 ml pool-Serum
0,35 ml Hanks-Lösung

Nr. 3: 0,2 ml autologes Serum
0,6 ml Hanks-Lösung

Nr. 4: 0,2 ml pool-Serum
0,6 ml Hanks-Lösung

Nach 15-minütiger Vorinkubation bei 37°C werden jedem Röhrchen 0,2 ml Staphylokokkus aureus bzw. im anderen Versuchsansatz 0,2 ml Pseudomonas aeruginosa hinzugefügt.
Unmittelbar danach werden jedem Röhrchen ein bestimmtes Quantum entnommen und nach Verdünnungsschritten (s.u.) auf eine Blutagarplatte übertragen ("Null-Wert").

Verdünnung: 0,05 ml aus den Versuchsansätzen werden zu 5 ml steriler NaCl-Lösung gegeben,
- davon 0,1 ml zu 0,9 ml NaCl-Lösung
- davon 0,1 ml auf einer Agarplatte ausspateln.

Auf die gleiche Weise werden nach 2 und 4 Stunden Kulturen angelegt. In den Zwischenzeiten werden die Röhrchen mit der Granulozyten-Bakteriensuspension in das geheizte Schüttelwasserbad gestellt.

Auswertung:

Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 können die Bakterienkulturen auf den Agarplatten ausgezählt werden. Durch Vergleich der Kolonienzahl nach 0 bzw. 4 Stunden Granulozyteninkubation wird die mittlere Abtötungsrate berechnet:

$$\frac{\text{Kolonien des 4-Stundenwertes}}{\text{Kolonien des 0-Stundenwertes}} \times 100 = x$$

100 -x = mittlere Abtötungsrate in %

Die Platte, die aus dem Röhrchen Nr. 1 beimpft wurde, gibt die Abtötungsrate mit autologem Serum (A) wider, aus Röhrchen Nr. 2 mit gepooltem Fremdserum (P).
Die Kulturen aus den granulozytenfreien Röhrchen Nr. 3 und Nr. 4 dienen als Kontrolle über etwaige Störungen im Wachstum der Bakterien.

4.2.3. STIMULIERTER NITROBLAUTETRAZOLIUMTEST

Materialien:

Sörensenpuffer (Herstellung s.u.)
Human Serum Albumin, Behringwerke
4-Nitroblautetrazoliumchlorid, Serva, Heidelberg
0,9% NaCl-Lösung
Methylgrün, Äthanol, Methanol, Xylol, aqua dest.
Wasserbad 37°C, Zentrifuge, Plastikröhrchen.

Methode: nach PREISIG et al. (49):

Vorbereitung:

Herstellung des Sörensenpuffers:

Lösung A: KH_2PO_4 9,08 g/l aqua dest.

Lösung B: Na_2HPO_4 11,88 g/l aqua dest.

285 ml Lösung A + 715 ml Lösung B ergibt 1.000 ml Sörensenpuffer, bei 18°C pH 7,2.

- Lösung Sörensenpuffer mit Albumin:
  in 100 ml Sörensenpuffer werden 15 mg Albumin gelöst.
- Herstellung der NBT-Suspension:
  in 10 ml Sörensenpuffer wird eine Spatelspitze NBT gelöst.
- für die Färbung der mikroskopischen Präparate werden 2 g Methylgrün in 100 ml aqua dest. gelöst und anschließend mit einem Scheidetrichter 4-mal in Chloroform gewaschen.
- 24 Stunden vor Versuchsbeginn werden Candida albicans auf Agarplatten angezüchtet. Am Versuchstag werden die Candida abgeerntet, 2-mal in NaCl-Lösung gewaschen, durch 10-minütiges Kochen abgetötet, wiederum 2-mal in NaCl.Lösung gewaschen und anschliessend auf ca. 1 - 2 x 10^8/ml NaCl-Lösung eingestellt.

Durchführung:

In zwei parallelen Versuchsansätzen werden 2 x 10^6 Granulozyten in Sörensenpuffer (mit Albumin) gewaschen (8 min bei 250 g).

- die sedimentierten Granulozyten werden in 100 µl Serum und 50 µl Sörensenpuffer (ohne Albumin) resuspendiert. Als Serum wird in einem Röhrchen autologes Patientenserum, im anderen heterologes pool-Serum verwendet.

Auch im folgenden Schritt wird nach autologem und pool-Serum getrennt:

0,1 ml der Serum-/Granulozytensuspension
0,2 ml NBT-Reagenz
0,1 ml Suspension der inaktivierten Candida

werden gemischt und 15 min im Schüttelwasserbad inkubiert.

- Anschließend werden Ausstriche angefertigt und in Methylgrün gefärbt.

- Färbung: 5 min in Methanol fixieren, trocknen lassen
10 min Färbung in Methylgrün
mit aqua dest. spülen
2 min in 70%-igem Alkohol tauchen
2 min in 96%-igem Alkohol
2 min in 100%-igem Alkohol
5 min in Xylol.

Auswertung:

Während der 15-minütigen Inkubation im Schüttelwasserbad kommt es zur Phagozytose der abgetöteten Candida durch Granulozyten. Bei der Phagozytose wird der Stoffwechsel der Granulozyten drastisch erhöht. Einige Stoffwechselprodukte führen dazu, daß das gelbliche Nitroblautetrazolium zu blauschwarzem Formazan reduziert wird, das dann zu einer sichtbaren Färbung der phagozytierenden Candida führt.

Die Auswertung unter dem Mikroskop erfolgt nach zwei Gesichtspunkten:

1. Bestimmung des NBT-Index.

Es werden 100 phagozytierende Candida ausgezählt und davon diejenigen angegeben, die bei der Phagozytose durch Formazan schwarz-

blau angefärbt wurden. Der NBT-Index gilt als Maß für die Stoffwechselaktivität der Granulozyten.

2. Bestimmung des Phagozytose-Index

Es werden 100 Granulozyten ausgezählt und davon diejenigen angegeben (in Prozent), die Candida albicans phagozytiert haben.

4.2.4. CHEMILUMINESZENZTEST

Materialien:

- 0,83%-ige NH_4Cl-Lösung
- Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (DPBS) Biochrom, Berlin
- Zymosan A, Sigma Chemical Company St. Louis, USA
- Luminol^R-100, Fa. Lumac
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Lumal Biocounter^R M 2000 mit Schreiber
- Kühlzentrifuge (4°C)

Methode: nach VAN DYKE et al. (59)

Vorbereitung:

Herstellung der Zymosansuspension:

- 8 mg Zymosan in 2 ml DPBS aufnehmen und 30 min im Wasserbad kochen
- 10 min bei 1.900 rpm abzentrifugieren
- Sediment in 10 ml DPBS aufnehmen

Herstellung der Luminollösung:

- 10 mg Luminol in 100µl DMSO aufnehmen
- mit aqua dest. auf 90 ml auffüllen (weißer Niederschlag bildet sich)
- pH-Wert auf 7,0 einstellen (Niederschlag löst sich auf)
- mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen.

Durchführung:

- um die Erythrozyten zu lysieren werden die Granulozyten in 5 ml 0,83%-igem NH_4Cl suspendiert
- 7 min Zentrifugation bei 50 g
- Granulozyten in DPBS waschen
- Granulozyten in Neubauer-Zählkammer zählen und auf 2×10^6/ml DPBS einstellen.

Versuchsansätze:	I	II
Puffer	450 µl	450 µl
Zymosan	250 µl	250 µl
Granulozytensuspension	125 µl	125 µl
Luminol	50 µl	50 µl
autologes Plasma	125 µl	-
Normalplasma	-	125 µl

Die einzelnen Komponenten werden in der angegebenen Reihenfolge in die Küvetten gegeben, gemischt und sofort im Lumac Biocounter^R gemessen.

Auswertung:

Bei der Phagozytose der Zymosanpartikel werden Stoffwechselprozesse des Granulozyten aktiviert. Dabei entstehen Moleküle, in denen sich Elektronen auf einem höheren Energieniveau befinden. Kehren die angeregten Elektronen zum Ausgangsniveau zurück, wird die Energiedifferenz in Form eines Photons emittiert. Eine Photozelle im Lumac Biocounter registriert diesen durch das Luminol verstärkten Lichtblitz und gibt das Ergebnis als "counts per minute" wider. Ein angeschlossener Schreiber notiert den zeitlichen Verlauf der Granulozytenaktivität in Form einer Kurve (Abszisse: Zeit, Ordinate: cpm).
Die Kurve wird gemessen nach

1. Höhe des erreichten Gipfels
2. Zeit bis zum Erreichen des Gipfels
3. maximale Anstiegsgeschwindigkeit.

Auf diese Weise sind Rückschlüsse auf Stoffwechselaktivitäten des Granulozyten möglich, die auch für die Abtötung von Bakterien wichtig sind.

4.2.5. CHEMOTAXIS DER GRANULOZYTEN

Materialien:

- Glycogen aus Miesmuscheln, Serva, Heidelberg
- RPMI 1640 Medium mit 2,0 g/l $NHCO_3$, Seromed, München
- Metallkammern nach Boyden
- Sartorius-Membranfilter aus Zellulosenitrat, Porengröße 3 µm, Durchmesser 24 mm.

Methode: nach WARD (60)

Vorbereitung:

Fertigstellung der Boydenkammern, die folgendermaßen aufgebaut sind:

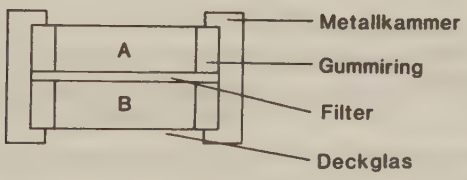

Abb. 2: Schematische Darstellung der verwendeten Boydenkammern im Längsschnitt

A und B bezeichnen die Hohlräume, in die später Granulozyten, bzw. Muschelglycogen eingefüllt werden (s.u.). Zum Einfüllen kann der Gummiring durch ein Loch in der Metallkammer mit einer Kanüle durchstochen werden.

Herstellung einer Suspension aus Muschelglycogen:
500 mg Muschelglycogen werden in 5 ml NaCl-Lösung aufgelöst.

Durchführung:

In Plastikröhrchen wird vorpipettiert:

1. 0,1 ml autologes Serum + 0,1 ml MG + 0,9 ml RPMI
2. 0,1 ml autologes Serum + 0,1 ml RPMI
3. 0,1 ml pool-Serum + 0,1 ml MG + 0,9 ml RPMI
4. 0,1 ml pool-Serum + 0,1 ml RPMI

(MG = Muschelglycogen)

Die Proben 1 und 3 werden 3-fach angefertigt, die Kontrollen 2 und 4 nur 1-fach.

- das Serum-/Mediumgemisch wird mit einer Spritze in den unteren Teil der Boydenkammer gefüllt (Hohlraum B).
- in den oberen Teil der Kammer (Hohlraum A) wird 1 ml einer verdünnten Granulozytensuspension (1 x 10^6 Zellen/ml gespritzt.
- die Kammern werden nun 30 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit befinden sich die Granulozyten im oberen Kompartiment der Kammer und können sich an der Oberfläche des Filters ablagern.

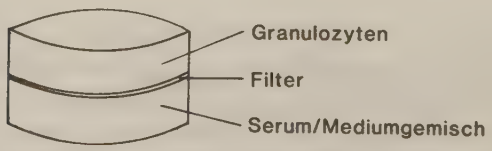

Abb. 3: Schematische Darstellung der gefüllten Boydenkammern

- anschließend werden die Kammern gewendet und weitere 2 Stunden 30 min inkubiert. Die Granulozyten befinden sich nun an der Unterseite des Filters und müssen entgegen der Schwerkraft durch die Poren des Filters hindurchwandern. In den Kammern 1 und 3 bildet das Muschelglycogen mit Serum den chemotaktischen Stimulus. Die Kontrollkammern 2 und 4 enthalten kein Muschelglycogen. Hier ist keine Chemotaxis zu erwarten.

- nach dem Ende der Inkubationszeit (Gesamtdauer 3 Stunden bei 37°C) werden die Kammern geöffnet, die Filter entnommen und gefärbt.
- Färbung: 5 sec in Methanol fixieren
  5 min Färbung in Hämalaun
  2 x 5 min in Leitungswasser wässern
  20 sec Färbung in Eosin
- die Filter werden auf Objektträger aufgezogen, mit einem Deckglas bedeckt und unter dem Mikroskop ausgewertet.

Auswertung:

Unter dem Mikroskop wird die Seite des Filters betrachtet, auf die die Granulozyten erst nach aktiver Wanderung gelangen konnten, d.h. die Seite auf der sich ursprünglich das zellfreie Chemotaxismedium befand.

Unter Verwendung eines 25-fach vergrößernden Objektivs werden 4 Gesichtsfelder ausgezählt und addiert. Die Summe der gezählten Granulozyten dient als Maß für die Fähigkeit zur Chemotaxis.

Von den 3-fach-Bestimmungen der Kammern 1 und 3 wird jeweils der Mittelwert gebildet.

4.2.6. BESTIMMUNG DER COMPLEMENTFAKTOREN C_3 UND C_4, DER COMPLEMENTAKTIVITÄT C_{H50} UND BESTIMMUNG DER IMMUNGLOBULINE IgG, IgM UND IgA

Diese Untersuchungen werden im Labor der Hämatologischen Abteilung der Kinderklinik der Universität Tübingen routinemäßig durchgeführt. Die Werte für C_3, C_4, IgG, IgM und IgA wurden durch radiale Immundiffusion unter Verwendung von M-Partigen^R-Immundiffusionsplatten (Behringwerke AG, Marburg) ermittelt. Die Complementaktivität C_{H50} wurde auf Quantiplate^R-K-Diffusionsplatten der Firma Biotest, Frankfurt, bestimmt.

5. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZUR GRANULOZYTENFUNKTION BEI MUCOVISCIDOSE

Wie schon in Kapitel 3. ausgeführt, wurde die Untersuchung an 22 Kindern und Jugendlichen vorgenommen, wobei von jedem Patienten 5 unterschiedliche Granulozytenfunktionstests durchgeführt werden sollten.
Allerdings musste bei manchen Patienten aus technischen Gründen (zu wenig Blut oder Serum, Test nicht auswertbar) auf einen Teil der Teste verzichtet werden. Deshalb setzen sich die Testergebnisse zum Teil aus weniger als 22 Einzelergebnissen zusammen. Bei der Testauswertung wurde berücksichtigt, ob autologes Patientenserum (A) oder "gepooltes" Fremdserum (P) verwendet wurde.

Als Vergleichswerte ("Normalwerte") werden im folgenden Ergebnisse verwendet, die unter Verwendung der gleichen Testmethoden an 32 gesunden, erwachsenen Versuchspersonen gewonnen wurden.
Lediglich für den Versuch der in vitro-Abtötung von Pseudomonas aeruginosa lagen keine Vergleichswerte vor. In Vorversuchen mit gesunden Versuchspersonen ergab sich durchweg eine bessere Abtötungsrate von Pseudomonas gegenüber Staphylokokkus aureus. Deshalb scheint es gerechtfertigt, die Normalwerte der Abtötungsrate von Staphylokokkus aureus auch bei den Versuchen mit Pseudomonas aeruginosa zu verwenden.

IN VITRO-ABTÖTUNG VON STAPHYLOKOKKUS AUREUS BZW. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Normalwerte	Mucoviscidose: Staph. aureus	Pseudomonas aeruginosa
A: $\bar{x}$ = 91%	A: $\bar{x}$ = 87%	A: $\bar{x}$ = 93,4%
s = 7,9%	s = 7,6%	s = 11,9%
P: $\bar{x}$ = 89,9%	P: $\bar{x}$ = 82,5%	P: $\bar{x}$ = 92,8%
s = 9,3%	s = 9,0%	s = 9,6%
n: 32	n: 21	n: 21

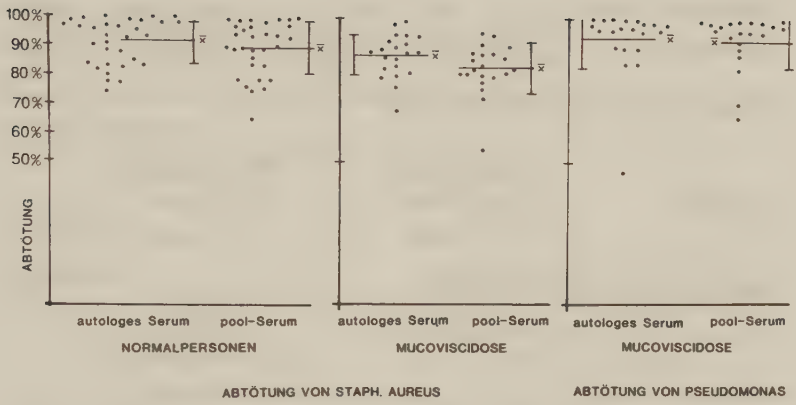

Abb. 4: Ergebnisse der Untersuchung über die in vitro-Abtötung von Staphylokokkus aureus bzw. Pseudomonas aeruginosa einschließlich Mittelwerte ± Standardabweichung

Zusätzlich wurde noch betrachtet, ob Patientenwerte außerhalb der normalen Streubreite lagen. Diese wurden definiert, als der Bereich zwischen dem niedrigsten und dem höchsten aufgetretenen Wert. Die Streubreite der Normalwerte lag bei diesem Test zwischen 74% - 100%.

Streubreite bei Mucoviscidose: Staphylokokkus aureus: 72% - 98%
Pseudomonas aeruginosa: 65% - 100%

Die Werte der Patienten mit Mucoviscidose lagen
- bei Abtötung von Staphylokokkus aureus:
  A: 1 Patient unterhalb der normalen Streubreite
  P: 2 Patienten unterhalb der normalen Streubreite

- bei Abtötung von Pseudomonas aeruginosa:
  A: 1 Patient unterhalb der normalen Streubreite
  P: 2 Patienten unterhalb der normalen Streubreite.

Beim Vergleich der Werte von gesunden Versuchspersonen und Mucovisci-

dosekranken ergab sich also kein signifikanter Unterschied in der Abtötungsfähigkeit von Staphylokokkus aureus bzw. Pseudomonas aeruginosa.

NITROBLAUTETRAZOLIUMTEST (NBT-TEST)

	Normalwerte	Mucoviscidose
NBT-INDEX:	$\bar{x}$ = 99,8%	$\bar{x}$ = 99,5%
	s = 0,6%	s = 1,3%
CANDIDA-PHAGOZYTOSE:	$\bar{x}$ = 65%	A: $\bar{x}$ = 68,6%
	s = 17,7%	s = 26,7%
		P: $\bar{x}$ = 72,9%
		s = 19,3%
	n = 32	n = 16

Bei der Phagozytose von Candida albicans lagen mit autologem Serum 2 Patienten unterhalb der normalen Streubreite, mit pool-Serum war es 1 Patient.
(Streubreite der Normalwerte: 42% - 91%,
Streubreite bei Mucoviscidose: 8% - 95%).

Auch bei diesem Test waren die Ergebnisse von Normalpersonen und Mucoviscidosekranken nahezu identisch.

CHEMILUMINESZENZUNTERSUCHUNG*

Normalwerte	Mucoviscidose
A: $\bar{x}$ = 20.700	A: $\bar{x}$ = 20.800
s = 3.850	s = 5.640
n = 26	n = 18
P: $\bar{x}$ = 21.000	P: $\bar{x}$ = 19.600
s = 5.300	s = 6.400
n = 26	n = 14

Mit autologem Serum lagen 2 Patienten, mit pool-Serum 3 Patienten außerhalb der normalen Streubreite.

(Streubreite der Normalwerte: 14.700 - 39.000,
Streubreite bei Mucoviscidose: 12.500 - 34.500).
Auch bei der Untersuchung der Chemilumineszenz fanden sich fast identische Ergebnisse.
*Alle Angaben in "counts per minute" (CPM)

CHEMOTAXIS

Normalwerte		Mucoviscidose	
A: $\bar{x}$ = 132		A: $\bar{x}$ = 65,3	
s = 66,8	n = 30	s = 69	n = 14
P: $\bar{x}$ = 114		P: $\bar{x}$ = 62,2	
s = 51,8	n = 30	s = 48,7	n = 22

Bei der Chemotaxis mit autologem Serum lagen 7 (von 14) unterhalb der normalen Streuung, mit pool-Serum waren es 9 (von 22).
(Streubreite der Normalwerte: 44 - 328,
Streubreite bei Mucoviscidose: 10 - 234).
Auch die Mittelwerte unterscheiden sich deutlich (s.o.).

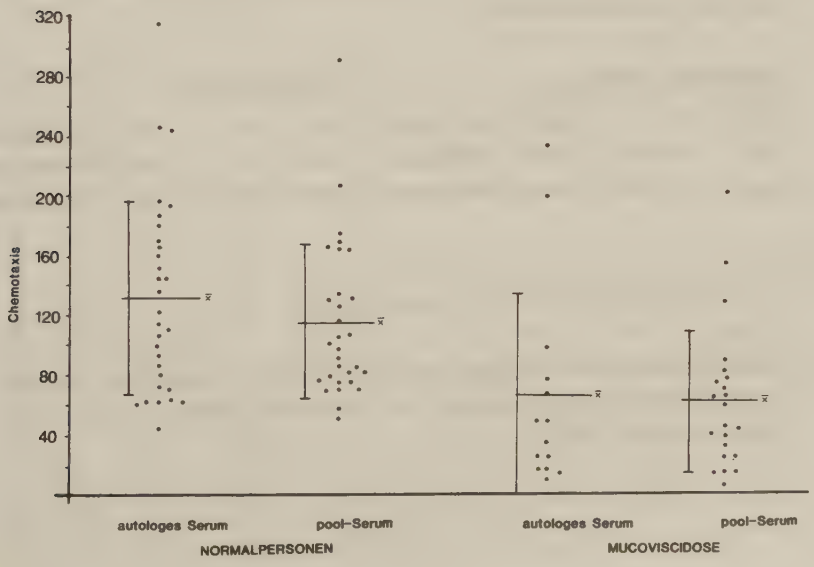

Abb. 5: Graphische Darstellung der Chemotaxiswerte
(Mittelwert $\bar{x} \pm$ Standardabweichung)

Deshalb wird geprüft, ob der Unterschied zwischen beiden Gruppen statistisch signifikant ist.

Da nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann (siehe Abb. 5), wurde ein parameterfreies Prüfverfahren, der U-Test von MANN und WHITNEY angewandt (11).
Es sollte geprüft werden, ob die Chemotaxiswerte von Mucoviscidosekranken signifikant unter den Werten der Normalpersonen liegen (einseitige Fragestellung).
Die statistische Prüfung erfolgte getrennt für die mit autologem oder pool-Serum gewonnenen Werte und führte zu folgendem Ergebnis:

Die Chemotaxiswerte der untersuchten Mucoviscidosekranken lagen für beide Gruppen hochsignifikant unter denen der Normalpersonen ($\alpha < 0{,}001$).

ERGEBNISSE DER ZUSÄTZLICHEN UNTERSUCHUNGEN

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in folgender Übersicht dargestellt. Das Symbol "↑" bedeutet ein über die Norm erhöhter Wert, "↓" ein zu niedriger Wert.

Complementfaktoren:			Immunglobuline:		
C_3:	4 ↑	von 13 Patienten	IgG:	5 ↑	von 13 Patienten
C_4:	1↑ , 1↓	von 13 Patienten	IgM:	2 ↑	von 14 Patienten
C_{H50}:	5↑ , 1↓	von 12 Patienten	IgA:	3↑ , 1↓	von 14 Patienten

5.2. TESTERGEBNISSE DER EINZELNEN PATIENTEN

Die folgenden beiden Tabellen geben die Ergebnisse wieder,die bei den verschiedenen Untersuchungen bei den einzelnen Patienten mit Mucoviscidose gewonnen wurden.

Tab. 4: Einzelergebnisse der Untersuchungen zur Granulozytenfunktion bei Mucoviscidose *

TEST	STAPH.AUREUS	PSEUDOMONAS	CHEMOTAXIS	CHEMILUMI-NESZENZ	NBT-INDEX	CANDIDA-PHAGOZYTOSE
Normalwerte (x)	90%	90%	A: 132 P: 114	20.700	99%	65%
Streubreite	74% - 100%		44 - 328	14.700 - 39.000		42% - 91%
	n = 32		n = 30	n = 26	n = 32	n = 32
PATIENT						
1. A.S., 17 Jahre	A: 98% P: 94%	A: 97% P: 99%	A: 15 P: 15	A: 27.500 P: 27.500	- -	- -
2. P.K. 20 Jahre	A: 94% P: 95%	A: 100% P: 99%	A: 67 P: 31	A: 15.000 P: 12.500	100%	A: 8% P: 16%
3. W.K. 24 Jahre	A: 94% P: 90%	A: 100% P: 96%	A: - P: 39	A: 30.000 P: 34.500	97%	A: 65% P: 72%
4. P.B. 16 Jahre	A: 90% P: 86%	A: 46% P: 70%	A: - P: 44	A: 18.500 P: 19.500	100%	A: - P: 86%
5: S.G. 16,5 Jahre	A: 80% P: 72%	A: 84% P: 65%	A: - P: 25	A: 14.000 P: 15.000	-	- -

PATIENT	STAPH. AUREUS	PSEUDOMONAS	CHEMOTAXIS	CHEMILUMI-NESZENZ	NBT-INDEX	CANDIDA-PHAGOZYTOSE
6. I.S. 15 Jahre	A: 91% P: 87%	A: 100% P: 93%	A: 49 P: 79	A: - P: -	100%	A: 80% P: 83%
7. A.H. 11,5 Jahre	A: 76% P: 76%	A: 98% P: 99%	A: 13 P: 5	A: 16.000 P: 16.500	100%	A: 90% P: 75%
8. V.H. 15,5 Jahre	A: 92% P: 81%	A: 97% P: 98%	A: 23 P: 40	A: 20.500 P: -	100%	A: 40% P: 60%
9. B.S. 15 Jahre	A: 81% P: 75%	A: 100% P: 98%	A: 49 P: 71	A: 18.000 P: 18.500	100%	A: 80% P. 95%
10. I.S. 16 Jahre	A: 88% P: 82%	A: 98% P: 100%	A: 17 P: 16	A: 19.000 P: 19.000	100%	A: 90% P: 79%
11. H.S. 9 Jahre	A: 94% P: 88%	A: 98% P: 99%	A: 234 P: 202	A: 20.500 P: -	100%	A: 49% P: 78%
12. B.B. 10 Jahre	A: 86% P: 88%	A: 99% P: 89%	A: 33 P: 45	A: 21.000 P: 14.500	100%	A: 90% P: 88%
13. T.F. 17 Jahre	A: 86% P: 81%	A: 97% P: 99%	A: - P: 130	A: 17.000 P: 14.500	100%	A: 90% P: 92%

PATIENT	STAPH. AUREUS	PSEUDOMONAS	CHEMOTAXIS	CHEMILUMI-NESZENZ	NBT-INDEX	CANDIDA-PHAGOZYTOSE
14. I.K. 11,5 Jahre	A: 89% P: 82%	A: 96% P: 96%	A: 200 P: 157	A: 23.000 P: 23.500	100%	A: 52% P: 94%
15. G.G. 12,5 Jahre	A: 84% P: 88%	A: 96% P: 98%	A: - P: 81	A: - P: -	-	A: - P: -
16. E.S. 16,5 Jahre	A: 83% P: 88%	A: 99% P: 95%	A: - P: 65	A: 15.500 P: -	100%	A: 87% P: 58%
17. O.B. 19 Jahre	A: - P: -	A: 98% P: 95%	A: - P: 73	A: 26.000 P: 25.500	100%	A: 87% P: 64%
18. S.H. 16,5 Jahre	A: 89% P: 82%	A: 89% P: 96%	A: - P: 17	A: 14.500 P: 12.000	100%	A: 86% P: 78%
19. M.M. 7 Jahre	A: 67% P: 53%	A: 90% P: 81%	A: 79 P: 60	A: - P: -	-	A: - P: -
20. R.R. 17,5 Jahre	A: 88% P: 80%	A: 97% P: 97%	A: 10 P: 23	A: - P: -	98%	A: 76% P: 48%
21. L.B. 16,5 Jahre	A: 79% P: 83%	A: 84% P: 87%	A: 99 P: 88	A: 25.000 P: 22.000	100%	A: 27% P: 69%

PATIENT	STAPH. AUREUS	PSEUDOMONAS	CHEMOTAXIS	CHEMILUMI-NESZENZ	NBT-INDEX	CANDIDA-PHAGOZYTOSE
22. D.F. 16 Jahre	A: 99% P: 91%	A: - P: -	A: 27 P: 63	A: 33.500 P: -	-	A: - P: -

*- Die Angaben bei "Staph. aureus, Pseudomonas, Candida" bezeichnen den Prozentsatz der phagozytierten Bakterien, bzw. Pilze

- Die Zahlenangaben bei "Chemotaxis" sind ein Maß für die Bewegungsaktivitäten der untersuchten Granulozyten (genauere Angaben in Kapitel 4.2.)
- Die Einheit im Chemilumineszenztest ist "counts per minute"
- Der "NBT-Index" gibt an, wieviel Prozent der phagozytierten Candida albicans durch Stoffwechselprodukte der Granulozyten gefärbt wurden.

Tab. 5: Einzelergebnisse der Untersuchungen der Complementfaktoren und der Immunglobuline.
(Diese Untersuchungen wurden erst später in das Versuchsprogramm aufgenommen, so daß erst ab Patient Nr. 8 Ergebnisse vorliegen).

Patient	IgG	IgM	IgA	C_3	C_4	C_{H50}
8. V.H.	1.600	132	94	-	-	-
9. B.S.	1.250	148	150	124	44	70
10. I.S.	1.400	132	200	120	28	52
11. H.S.	1.300	132	174	132	60	70
12. B.B.	2.720	260	426	160	48	90
13. T.F.	-	-	-	-	-	-
14. I.K.	1.140	90	50	132	32	90
15. G.G.	2.640	276	474	84	22	52
16. E.S.	1.460	172	210	100	42	42
17. O.B.	-	120	760	96	48	-
18. S.H.	2.980	208	386	56	34	37
19. M.M.	940	136	102	100	40	46
20. R.R.	2.200	110	384	94	26	65
21. L.B.	1.540	158	230	51	12	51
22. D.F.	2.260	96	440	92	36	44

6. DISKUSSION

Ausgehend von der Beobachtung gehäufter Infektionen mit Staphylokokken und Pseudomonaden stand bei der Planung der Granulozytenversuche die Frage ganz im Vordergrund, ob ein Abtötungsdefekt speziell gegen diese Keime die Ursache der Infektionen bei Mucoviscidose sein könnte. Deshalb soll zuerst der Test beschrieben werden, der am besten geeignet ist, diese Frage zu beantworten.

6.1. IN VITRO-ABTÖTUNG VON STAPHYLOKOKKUS AUREUS UND PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Der Versuch der in vitro-Abtötung kann als eine Art "Screening-Versuch" zur Granulozytenfunktion aufgefaßt werden, bei dem summarisch mehrere Fähigkeiten des Granulozyten geprüft werden, ohne aber spezielle Schritte zu untersuchen.
In einer Pufferlösung wird eine Suspension aus definierten Mengen von Granulozyten und Bakterien hergestellt und über 4 Stunden unter ständigem Schütteln inkubiert. Durch das Schütteln kommt es zu zufälligen Begegnungen von Bakterien und Granulozyten, d.h. die Fähigkeit zur aktiven und gerichteten Bewegung des Granulozyten (Chemotaxis) wird in diesem Versuch nicht erfaßt.
Alle anderen Einzelschritte wie Opsonierung, Phagozytose, Degranulierung und enzymatische Aktivierung sind zur Abtötung der Bakterien notwendig und bestimmen das Testergebnis. Die Abtötungsrate wird durch Vergleich der Zahl der Bakterien vor und nach der Inkubation ermittelt. Als Bakterien wurden in getrennten Ansätzen Pseudomonas aeruginosa und Staphylokokkus aureus verwendet.

Die Versuche mit Granulozyten von mucoviscidosekranken Kindern und Jugendlichen haben gezeigt, daß grundsätzlich kein spezifischer Abtötungsdefekt gegen die Erreger vorliegt, die bei Mucoviscidose am häufigsten Infektionen verursachen. Sowohl mit gram-positiven Staphylokokken, als auch mit gram-negativen Pseudomonaden ergab sich eine normale Abtötungsrate, wobei Pseudomonas sogar geringfügig besser bewältigt wurde als von den Normalpersonen. In den Ergebnissen zeigte sich kein Unterschied

ob Eigenserum oder ein Mischserum von gesunden Spendern verwendet wurde.
Hinzuzufügen ist, daß es sich bei dem im Test verwendeten Pseudomonasstamm um eine nicht-mucoide Form handelte. Wie schon in Kapitel 2.2. erwähnt, finden sich bei den chronischen c.f.-Bronchitiden aber hauptsächlich mucoid-Formen, deren Schleimkapsel die Phagozytose erschwert und vielleicht auch zu einem anderen Ergebnis bei den in vitro-Versuchen geführt hätte (53, 55).
Diesem möglichen Einwand ist entgegenzuhalten, daß auch bei c.f.-Bronchitiden die Umwandlung in mucoid-Formen erst nach einiger Zeit geschieht, und bis zu diesem Zeitpunkt eine längere Auseinandersetzung mit nicht-mucoiden Formen stattfinden muß. Eine Erstinfektion mit mucoid-Formen ist durch deren seltenes Vorkommen sehr unwahrscheinlich. Aus diesem Grunde ist eine Aussage über die Abtötungsfähigkeit auch gegenüber nicht-mucoiden Pseudomonaden von Bedeutung.
Einer der Schritte, der auch bei diesem in vitro-Abtötungsversuch beteiligt ist, nämlich die Phagozytose, wurde 1972 von BÖHME näher untersucht (5).
Er ermittelt die Phagozytoserate von Granulozyten in vitro durch Auszählung phagozytierter Bakterien (Staphylokokkus aureus) und fand bei Mucoviscidose die Zahl der pro Granulozyt phagozytierten Bakterien signifikant verringert. Seine Folgerung einer verminderten zellulären Infektabwehr durch diesen Phagozytosedefekt kann nach den eigenen Ergebnissen nicht bestätigt werden. Eine etwaige Minderleistung bei der Phagozytose hatte keinen Einfluß auf die in vitro-Abtötungsrate. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen fand sich kein Anhalt für einen spezifischen Abtötungsdefekt der Granulozyten bei Mucoviscidose. Dem entspricht auch das Resultat des für diese Arbeit durchgeführten NBT-Tests, in dem sich eine normale Phagozytoserate von Candida albicans fand.
Diese Ergebnisse decken sich auch mit der klinischen Beobachtung, daß bei Mucoviscidose trotz der ausgedehnten chronischen und teilweise exacerbierenden Bronchitiden, die als ständige Streuherde betrachtet werden müssen, nur äußerst selten Septicämien auftreten. Das heißt, auch in vivo werden die ins Blut gelangenden Bakterien von einem funktionierenden Abwehrsystem und von funktionstüchtigen Granulozyten abgetötet und an ihrer Ausbreitung gehindert.
Damit bleibt aber weiterhin ungeklärt, warum sich die bakteriziden Eigenschaften der Granulozyten in der Lunge von Mucoviscidosekranken

nicht auswirken, obwohl diese sowohl in vitro als auch durch klinische Beobachtungen bestätigt werden können.

6.2. DER STIMULIERTE NBT-TEST

Eine der Möglichkeiten, den Stoffwechsel der Granulozyten näher zu untersuchen ist der NBT-Test. Nitroblautetrazolium (NBT) ist ein gelber Fabrstoff, der durch Elektronenaufnahme in das blauschwarze, schwer lösliche Formazan übergeführt wird. Durch Phagozytose aktivierte Granulozyten sind normalerweise in der Lage, das Nitroblautetrazolium zu reduzieren. Der mikroskopische Nachweis der entstandenen Formazangranula dient als Indikator für enzymatische Stoffwechselschritte, die für die Abtötung von Katalase-positiven Bakterien unbedingt notwendig sind.

Ein Beispiel dafür ist das Krankheitsbild der Septischen Granulomatose. Klinisch zeichnet es sich durch zahlreiche bakterielle Infektionen mit granulomatösen Organmanifestationen aus. Bei Untersuchungen der Granulozytenfunktion findet sich zwar eine normale Phagozytose der pathogenen Keime, aber eine fehlende intrazelluläre Abtötung. Der NBT-Test ist stets negativ und dient als Beweis für diese Krankheit. Obwohl sich die Krankheitsbilder der Septischen Granulomatose und der Mucoviscidose schon klinisch in vielen Punkten unterscheiden, interessierte dennoch der Ausgang des NBT-Testes bei Patienten mit Mucoviscidose.

Das Ergebnis des NBT-Testes bei Mucoviscidose ergab keinerlei Hinweise auf einen Defekt in den geprüften Funktionen. Der Anteil der Granulozyten, die Candida albicans phagozytiert hatten, lag sogar etwas über der Norm. Praktisch alle durch Phagozytose aktivierten Granulozyten konnten das NBT zu Formazan reduzieren.

HAGER-MALECKA (21) kommt in einer Untersuchung mit einem Latex-stimulierten NBT-Test zu der gleichen Aussage.
Widerspruch findet sich in zwei anderen Arbeiten:
MANCINI et al. (37) fanden nach Latexstimulation eine signifikant ver-

ringerte NBT-Reduktion bei Mucoviscidose. HOLLAND et al. (24) verwendeten zur Phagozytose mit IgG überzogene Polyacrylpartikel. Unter Zusatz von fetalem Kälberserum ergab sich eine gegenüber der Norm gesteigerte Granulozytenaktivität, während die Verwendung von autologem Mucoviscidoseserum zu einem signifikanten Aktivitätsverlust führte. Dies führte zu der Vermutung eines im Serum enthaltenen Hemmkörpers bei intakten Granulozyten.
Die Gründe für die widersprüchlichen Ergebnisse sind nicht bekannt. Unterschiede in der Auswahl der Patienten, sowie die unterschiedlichen Methoden sind die wahrscheinlichste Erklärung.
In Beurteilung der verschiedenen Arbeiten kann sicherlich davon ausgegangen werden, daß die Ursache der gehäuften Infektionen bei Mucoviscidose nicht in einem Defekt der bakteriziden Enzyme des Granulozyten zu suchen ist.
Der Vollständigkeit halber und um Mißverständnisse zu vermeiden, soll noch kurz auf eine Variante des NBT-Tests hingewiesen werden, die von einigen Autoren,auch bei Mucoviscidose, durchgeführt wurde. Es handelt sich um den spontanen NBT-Test nach PARK et al. (47). Dieser beruht darauf, daß ruhende, nichtstimulierte Granulozyten auf NBT normalerweise nicht reduzierend wirken. Verwendet man aber Granulozyten von Patienten mit bakteriellen Infekten, findet sich eine spontane NBT-Reduktion. Auf diese Weise wäre es möglich, die Anwesenheit von bakteriellen Infekten, bzw. den Erfolg einer antibiotischen Therapie nachzuweisen. Während SULLIVAN (57) diese Möglichkeit auch für die Oberwachung der Mucoviscidosekranken sieht, fanden BERRY und BREWSTER (4) eine generell erhöhte, nicht infektabhängige spontane NBT-Reduktion.
Unabhängig von der genauen Bedeutung für den Infektnachweis ist auch die Tatsache der spontanen NBT-Reduktion ein Hinweis auf einen grundsätzlich intakten Stoffwechsel der Granulozyten bei Mucoviscidose.

6.3. CHEMILUMINESZENZUNTERSUCHUNGEN

Ähnlich wie der im vorigen Kapitel beschriebene NBT-Test, erlaubt auch die Chemilumineszenzuntersuchung Aussagen über den Stoffwechsel akti-

vierter Granulozyten.
Zu einer Suspension aus Puffer, Luminol, Plasma und Zymosanpartikeln wird eine definierte Menge Granulozyten gegeben. Die Phagozytose des Zymosans steigert drastisch die Stoffwechselaktivität des Granulozyten. Es kommt zur Aktivierung des Hexose-Monophosphatshunts, einem erhöhten Sauerstoffverbrauch ("respiratory burst") und zur Produktion von bakteriziden, oxydierenden Substanzen, wie Superoxid O_2^- , Wasserstoffperoxid H_2O_2 und dem Hydroxylradikal $OH^\cdot$.
Kehrt in diesen angeregten Molekülen das Elektron auf sein Ausgangsniveau zurück, wird ein Photon emittiert.
Im Chemilumineszenztest wird dieses geringe Quantum an Licht durch Luminol, einem zyklischen Hydrazid verstärkt, von einer Photozelle erfasst und in "counts per minute" registriert. Auf diese Weise sind Rückschlüsse über den oxidativen Stoffwechsel der Granulozyten möglich.

Bei der Chemilumineszenzuntersuchung an Granulozyten von Patienten mit Mucoviscidose ergab sich kein Unterschied zu den Ergebnissen von Normalpersonen. Sowohl mit autologem Plasma, als auch mit Plasma von gesunden Spendern zeigte sich kein Hinweis auf eine Störung der oxidativen Stoffwechselprozesse, die beim Abtöten von Bakterien von Bedeutung sind.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen GRAFT u. Mitarb. (20). Sie fanden eine normale Chemilumineszenz, wobei ihnen auffiel, daß der Höchstwert (in "counts per minute") beschleunigt erreicht wurde. Diesen Befund interpretierten sie unter Berufung auf eine Arbeit von BARBOUR et al. (2) als Folge von subklinisch verlaufenden Infektionen bei den klinisch infektfreien Mucoviscidosepatienten. BARBOUR et al. hatten bei Patienten mit aktiven bakteriellen Infektionen eine gesteigerte Chemilumineszenz der Granulozyten festgestellt.
Neben der Bestätigung eines funktionierenden Stoffwechsels der Granulozyten bei Mucoviscidose liefert die Chemilumineszenzuntersuchung noch ein weiteres Ergebnis: Für die Phagozytose ist die Opsonierung durch verschiedene humorale Faktoren Voraussetzung. Da kein Unterschied bei Verwendung von autologem c.f.-Plasma oder Normalplasma festgestellt wurde, kann wohl von einer normalen Funktion,auch der humoralen Faktoren, ausgegangen werden.

6.4. CHEMOTAXIS

Im normalen zeitlichen Ablauf der Granulozytenfunktion steht die Chemotaxis ganz am Anfang der Teilschritte und hätte demzufolge auch an den Anfang der Diskussion gestellt werden müssen. Weil die Diskussion dieses Schrittes aber am umfangreichsten geriet und zum Teil auf dem Vorhergesagten aufbaut, wurde sie an die letzte Stelle gesetzt.
Die Fähigkeit des Granulozyten zur Chemotaxis ist für die Gesamtfunktion deshalb von so großer Bedeutung, weil dieser Schritt die Voraussetzung für alle anderen Funktionen darstellt. Erst nach aktiver Bewegung und Anreicherung in großer Zahl am Ort der Infektion können die phagozytierenden Zellen ihre Aufgaben bei der bakteriellen Abwehr erfüllen. Chemotaxis beinhaltet sowohl das Erkennen chemotaktischer Stimuli, als auch die Reaktion in Form einer gerichteten Migration.

Für die vorliegende Arbeit wurde ein in vitro-Test nach BOYDEN (6) durchgeführt. Eine Metallkammer wird durch ein Filterpapier in zwei Kompartimente unterteilt. Während auf der einen Seite des Filters die Granulozyten eingebracht werden, wird die andere Seite mit chemotaktisch wirkendem Muschelglycogen und Serum gefüllt. Die aktivierten Granulozyten wandern auf die andere Seite des Filters, wobei sie sich durch 3 µm große Poren "hindurchzwängen" müssen. Als Maß für die chemotaktische Aktivität werden auf einer bestimmten Fläche die Granulozyten ausgezählt, die den Filter passiert haben.

Die Versuche mit Granulozyten von Patienten mit Mucoviscidose ergaben eine signifikant erniedrigte Chemotaxisfähigkeit. Die Chemotaxis war sowohl mit autologem Patientenserum,als auch mit gepooltem Fremdserum verringert. Wäre der Chemotaxisdefekt auf veränderte Serumfaktoren zurückzuführen, dann wäre mit dem Serum von gesunden Spendern ("pool-Serum") eine Normalisierung des Ergebnisses zu erwarten gewesen. Da dies nicht eintrat, muß von einer zellulären Minderleistung ausgegangen werden.

6.4.1. BEGLEITFAKTOREN, DIE ZU EINER VERÄNDERTEN CHEMOTAXIS FÜHREN KÖNNEN

Die Chemotaxis der Granulozyten ist ein komplexer Vorgang, der von vielen verschiedenen Faktoren beeinflußt werden kann. Das Ergebnis von Untersuchungen der Chemotaxis hängt zum einen von der Testmethode, zum anderen von der Wahl der Patienten ab.

In Tabelle 6 wird das Ergebnis der eigenen Untersuchung verglichen mit den Ergebnissen anderer Autoren. Auch die Auswahl der Patienten und die Art der Methode wird in den Test miteinbezogen.

Tab. 6: Die Chemotaxis bei Mucoviscidose - Obersicht über verschiedene Untersuchungen.

Autoren:	HILL et al., 1974 (22)
Patienten:	15 Mucoviscidosepatienten mit akutem Infekt
	15 Mucoviscidosepatienten ohne akuten Infekt
	25 Patienten als Kontrollgruppe, infektfrei
Methode:	Chemotaxis in Boydenkammern,
	Filter mit 5µm Porendurchmesser
	Coli-Filtrat als chemotaktische Substanz
Ergebnis der Chemotaxis:	Gruppe c.f. mit Infekt hatte erhöhte Chemotaxis (185)
	Gruppe c.f. ohne Infekt normale Chemotaxis (70)
	Wert der Kontrollgruppe 70.
Autoren:	CHURCH et al., 1979 (9)
Patienten:	20 Mucoviscidosepatienten, alle fieberfrei, kein Infekt
	10 gesunde Erwachsene als Kontrolle
Methode:	Agarosegel-Technik nach Klein, bei der die Granulozyten auf der Oberfläche des Agarosegels wandern.
	Zymosan-aktiviertes Serum als chemotaktische Substanz.
Ergebnis:	Normale Chemotaxis der Mucoviscidosepatienten,auch c.f.-Serum hatte keinen Einfluß auf Kontrollgranulozyten.

Fortsetzung der Tab. 6

Autoren:	CHURCH et al., 1980 (10)
Patienten:	21 Mucoviscidosepatienten, alle mit Fieber und Infekt
Methode:	Wie Church et al., 1979 (s.o.)
Ergebnis:	Die Chemotaxiswerte der c.f.-Patienten waren leicht, aber nicht signifikant erhöht. (c.f.-Wert: 349, Kontrollwert: 281)

Autoren:	ZIELINSKI et al., 1982 (64)
Patienten:	27 Mucoviscidosepatienten, davon 22 infektfrei 15 gesunde Probanden als Kontrollgruppe
Methode:	Chemotaxis in Boydenkammern Filter mit 3µm Porendurchmesser Zymosan und Casein als chemotaktische Substanz
Ergebnis:	signifikant verringerte Chemotaxis der Gruppe mit Mucoviscidose, sowohl mit Zymosan, als auch mit Casein.

Ergebnis der vorliegenden Arbeit:

Patienten:	22 Mucoviscidosepatienten, davon 5 Patienten mit leichtem Infekt, alle fieberfrei
Methode:	Chemotaxis in Boydenkammern, Filter mit 3µm Porendurchmesser, Muschelglycogen als chemotaktische Substanz
Ergebnis:	signifikant verringerte Chemotaxis der Gruppe mit Mucoviscidose, sowohl mit autologem Patientenserum, als auch mit Serum von gesunden Spendern.

Obwohl die Ergebnisse auf den ersten Blick widersprüchlich aussehen, lassen sich doch einige Tendenzen erkennen:

Bei Mucoviscidosepatienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung an einer frischen Infektion erkrankt waren, fanden zwei Autoren eine leichte bis starke Erhöhung der Chemotaxis. Bei den nicht akut Infizierten wurden normale und signifikant verminderte Werte festgestellt.
Bei einer Aussage über die Chemotaxis bei Mucoviscidose muß also auch der klinische Zustand der Patienten berücksichtigt werden. Insbesondere muß differenziert werden, ob bei den untersuchten Patienten ein frischer oder ein chronischer Infekt, oder aber Infektfreiheit vorliegt. Allerdings sollte auch bei Fehlen von Entzündungszeichen der Einfluß von subklinisch verlaufenden Keimauseinandersetzungen bei Mucoviscidose in Betracht gezogen werden.

Wie aus anderen Untersuchungen hervorgeht, haben infektiöse Prozesse per se einen Einfluß auf die Chemotaxis der Granulozyten (31). Über die Art der Beeinflussung - ob erhöhte oder verringerte Chemotaxis - werden unterschiedliche Aussagen gemacht. Selbst wenn man differenziert, ob jeweils bei akuten oder chronischen Entzündungen untersucht wurde, ergibt sich kein einheitliches Resultat. Zu verschieden waren die Wahl der Patienten und Methoden um die Ergebnisse dieser Arbeiten direkt vergleichen zu können. Prinzipiell ist jedoch unbestritten, daß während einer Infektion Veränderungen der Chemotaxis stattfinden können.

Hinsichtlich der Fragestellung dieser Arbeit, ob ein Granulozytendefekt die Ursache der Infektionen bei Mucoviscidose sein könnte, ergeben sich aus dem oben Gesagten neue Überlegungen: Handelt es sich bei der verminderten Chemotaxis, die in den Laboruntersuchungen festgestellt wurde um einen primären Defekt bei Mucoviscidose, oder ist die veränderte Chemotaxis lediglich als Folge der verschiedenen krankheitsbedingten Veränderungen aufzufassen?
Die Antwort auf diese wichtige Frage wird zusätzlich dadurch erschwert, daß bei den untersuchten Patienten noch weitere Faktoren wirksam sind, die für sich genommen schon die Chemotaxis verändern können.

Das Alter der untersuchten Patienten mit Mucoviscidose reichte von 7 bis 28 Jahre. Das mittlere Alter betrug 15 ± 3,8 Jahre ($\bar{x}$ ± Standardabweichung).
Um eine etwaige Altersabhängigkeit der Chemotaxiswerte festzustellen, wurde in Abb. 6 das Patientenalter mit dem Testergebnis korreliert.

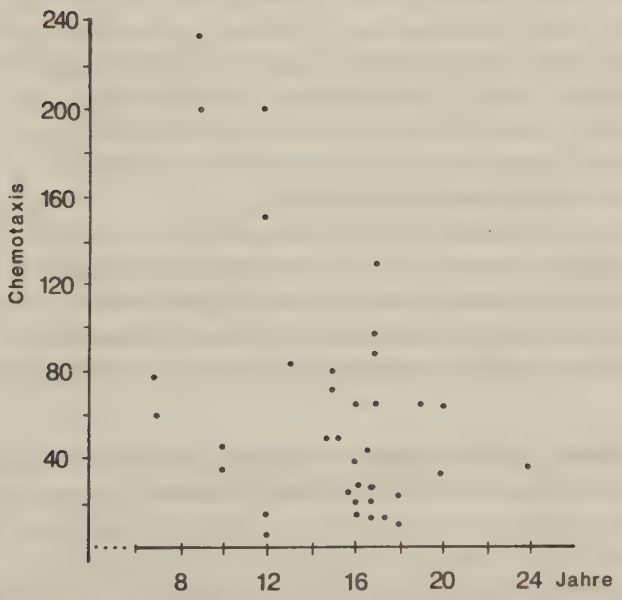

Abb. 6: Chemotaxis in Relation zum Alter der Patienten

Den Untersuchungen an gesunden Kindern zufolge, wäre mit zunehmendem Alter ein Anstieg der Chemotaxis zu erwarten (32). Dieser Anstieg parallel zum Alter findet sich bei den untersuchten Patienten

mit Mucoviscidose nicht. Eher könnte von einer Abnahme der Werte bei den älteren Jugendlichen und Erwachsenen gesprochen werden. Möglicherweise hat also die Dauer der Krankheit, die ja eng mit dem Alter der Patienten zusammenhängt, einen negativen Einfluß auf die Chemotaxis der Granulozyten. Allerdings liegen in den einzelnen Altersgruppen zu wenig Werte vor, um diesbezüglich eine sichere Aussage machen zu können.

Im Komplementsystem, dessen Aktivierung für das Zustandekommen von Chemotaxis eine wichtige Rolle spielt, wurden normale bis erhöhte Werte gefunden, wobei allerdings nur C_3, C_4 und C_{H50} bestimmt wurden. Andere Untersucher die das Komplementsystem bei Mucoviscidose genauer analysierten, kamen zu keinen einheitlichen Ergebnissen (38). Die Komponente C_3 wurde von mehreren Autoren erhöht gefunden. Bei den eigenen Ergebnissen fand sich bei 4 von 13 Patienten ein erhöhtes C_3, bei 5 von 12 erhöhte Werte für C_{H50}. Der Wert von C_4 war gegenüber der Norm 1-mal erhöht und 1-mal erniedrigt. TALAMO (39) interpretiert die erhöhten Werte im Komplementsystem als Folge der chronisch entzündlichen Prozesse bei Mucoviscidose. Ein Defekt der Komplementfaktoren, der in direktem Zusammenhang mit einer verminderten Chemotaxis stehen könnte, wurde von keinem der Autoren gefunden.

Ein weiterer Faktor, der die Chemotaxis beeinflussen könnte, ist der Ernährungszustand. So wurde bei unterernährten Kindern mit Kwashiokor eine verminderte Chemotaxis festgestellt. Bei Mucoviscidosekindern kann zwar nicht von Unterernährung in dem Ausmaß wie bei Kwashiokor gesprochen werden, aber Gedeihstörungen gehören aufgrund der intestinalen Veränderungen fest zu diesem Krankheitsbild.
Bei 13 von 22 Patienten der vorliegenden Untersuchung lag das Gewicht bei der 3. Percentile und z.T. noch wesentlich darunter. In Abb. 7, wo die Gewichtsperzentilen dargestellt sind, ergibt sich allerdings keine eindeutige Korrelation.
Welche Bedeutung der Ernährungszustand für die Chemotaxis bei Mucoviscidose hat, ist schwer zu beantworten. Grundsätzlich sollte er als beeinflussender Faktor in Betracht gezogen werden.

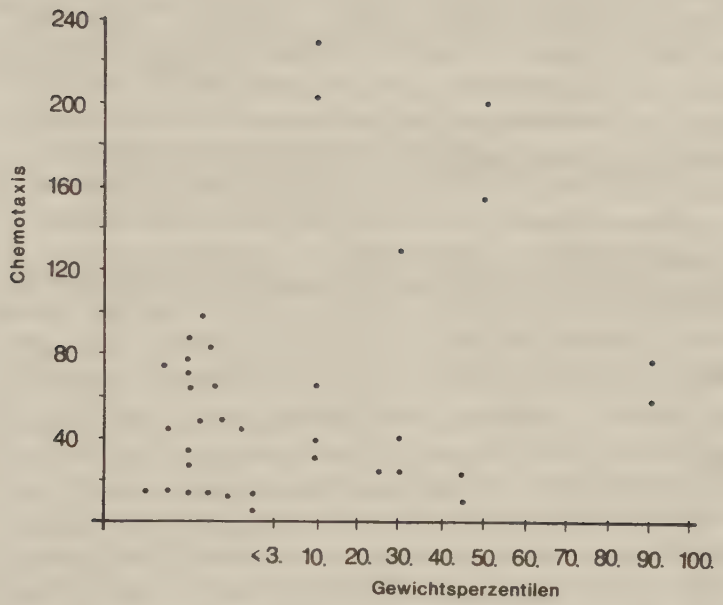

Abb. 7: Darstellung der Chemotaxiswerte in Abhängigkeit von den jeweiligen Gewichtsperzentilen.

Auch Medikamente können die Bewegungsfähigkeit der Granulozyten herabsetzen. Alle Patienten dieser Untersuchung wurden mit enzymsubstituierenden Präparaten (Pankreon^{R}, Lipazym^{R}) und Sekretolytika (Fluimicil^{R}) behandelt. Ob die Sekretolytika, die als wesentlichen Bestandteil N-Acethylcystein enthalten, die Chemotaxis beeinflussen können, ist nicht bekannt. Für die Pankreaspräparate als physiologische Enzyme kann es nahezu mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Dagegen weiß man von verschiedenen Antibiotika, daß sie schon in therapeutischen Dosen die chemotaktische Antwort vermindern können (17). Dies trifft vor allem auf die Gruppe der Tetracycline zu, mit denen 9 der 22 Patienten behandelt wurden (Vibramycin^{R}). 7 Patienten bekamen andere Antibiotika (Staphylex^{R}, Refobacin^{R} und Bactrim^{R}) und nur 6 waren ohne Chemotherapie. In Abb. 8 ist dargestellt, wie die Chemotaxis unter Behandlung mit den verschiedenen Antibiotika ausfiel. Dabei zeigt sich, daß die antibiotikafreien Mucoviscidosepatienten keineswegs bessere Werte hatten als die unter den verschiedenen Antibiotika stehenden Patienten. Darin könnte ein Indiz gesehen werden, daß die antibakterielle Therapie in dieser Untersuchung keine entscheidene Rolle bei der Verminderung der Chemotaxis gespielt hat.

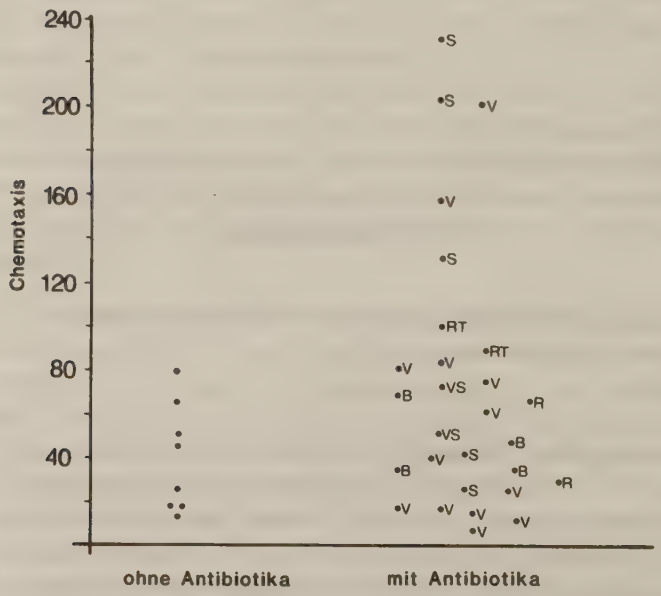

Abb. 8: Die Chemotaxiswerte in Abhängigkeit von der Einnahme verschiedener Antibiotika

Legende: S = Staphylex^{R}, V = Vibramycin^{R}, R = Refobacin^{R}, B = Bactrim^{R}, T = Trimethoprim^{R}

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß eine Beurteilung der einzelnen Faktoren und ihr Einfluß auf die Laboruntersuchungen sehr schwer ist. Besonders die Unterscheidung zwischen Ursache und Folge einer bestimmten Erscheinung stellt bei den Mucoviscidosepatienten ein großes Problem dar.

6.5. THEORETISCHE OBERLEGUNGEN ZU DEN MÖGLICHEN AUSWIRKUNGEN EINER DEFEKTEN CHEMOTAXIS

Unabhängig von den Faktoren, die im vorhergegangenen Kapitel erörtert wurden, kann man Folgerungen darüber anstellen, welche Auswirkungen eine defekte Chemotaxis hätte, und ob diese Oberlegungen mit den beobachteten Krankheitserscheinungen bei Mucoviscidose übereinstimmen.

Ein genereller Migrationsdefekt müsste ausgedehnte, schwerste Infektionen zur Folge haben, weil die phagozytierenden Zellen als wichtiger Teil der unspezifischen Immunabwehr sich nicht mehr am Ort der Infektion anreichern würden. Infektionen wären vor allem an den Körperoberflächen zu erwarten, die am meisten den pathogenen Keimen ausgesetzt sind. Bei Mucoviscidose fällt aber nur das gehäufte Auftreten von Bronchopneumonien auf. Gastroenteritiden, Infektionen des Urogenitaltraktes oder der Haut - z.B. Furunkel oder Abszesse durch Staphylokokken - oder andere Oberflächeninfekte werden nicht häufiger als in der Normalpopulation gefunden.
Eine defekte Chemotaxis kann also nicht die alleinige Ursache der lokalisierten Infektionen bei Mucoviscidose sein. Sollte eine verringerte Granulozytenbeweglichkeit pathogenetisch eine Rolle spielen, dann nur unter den veränderten Bedingungen der Lunge bei Mucoviscidose.

6.6. DIE ENTZONDLICHE REAKTION IN DER LUNGE UND DIE ROLLE VON GRANULOZYTEN UND ALVEOLARMAKROPHAGEN

Eine ausführliche Diskussion über die entzündliche Reaktion in der Lunge bei Mucoviscidose würden den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

Zudem wurden die Funktionsuntersuchungen an Granulozyten des peripheren Blutes durchgeführt. Eine Aussage über die Funktionsfähigkeit der Granulozyten in der Lunge ist anhand der eigenen Untersuchungen nur bedingt möglich. Dennoch sollen unter Heranziehung anderer Untersuchungen einige Aspekte dieses Problems andiskutiert werden.

Aus therapeutischen Gründen muß bei Mucoviscidosepatienten unter bestimmten Umständen eine Bronchiallavage durchgeführt werden. Bei dieser Gelegenheit kann unter anderem auch die Zellzahl in der Lavageflüssigkeit und die Relation der verschiedenen Zellarten zueinander bestimmt werden.
REYNOLDS und NEWBALL (51) fanden bei der Bronchiallavage mucoviscidosekranke Kinder einen Anteil von 85% Granulozyten, von denen allerdings nur 30% intakt waren. In einer Arbeit von PENNINGTON et al. (48) wird berichtet von 67% Granulozyten und ebenfalls eine geringe Lebensfähigkeit der Zellen festgestellt. Auch bei SORDELLI et al. (56) dominierte die Zahl der Granulozyten, wobei er aber eine normale Lebensfähigkeit (90%) angibt. Bei infizierten Normalpersonen (ohne c.f.) fand er ähnliche Verhältnisse, während bei gesunden Normalpersonen fast keine Granulozyten gefunden wurden (27).
Ergänzend zu den vorangegangenen Überlegungen zur Chemotaxis muß also festgehalten werden, daß die Granulozyten auch bei Mucoviscidose die Lunge in großer Zahl erreichen. Die Ergebnisse bei Mucoviscidose unterscheiden sich hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung nicht von denen, die bei anderen Patienten mit Bronchopneumonien gewonnen wurden.
Umso rätselhafter bleibt weiterhin, warum bei Mucoviscidosekranken am Ort der Infektion keine ausreichende bakterielle Abwehr zustandekommt, obwohl doch scheinbar alle Bedingungen dafür erfüllt sind. Einer der möglichen Gründe könnte in einer verminderten Lebensfähigkeit der Granulozyten in der Lunge liegen, die von einigen Autoren bei der Bronchiallavage gefunden wurde.
Neben den Granulozyten finden sich in der Lunge phagozytierende Zellen aus einer anderen Zellreihe, die ortsständigen Alveolarmakrophagen (Abb. 9).

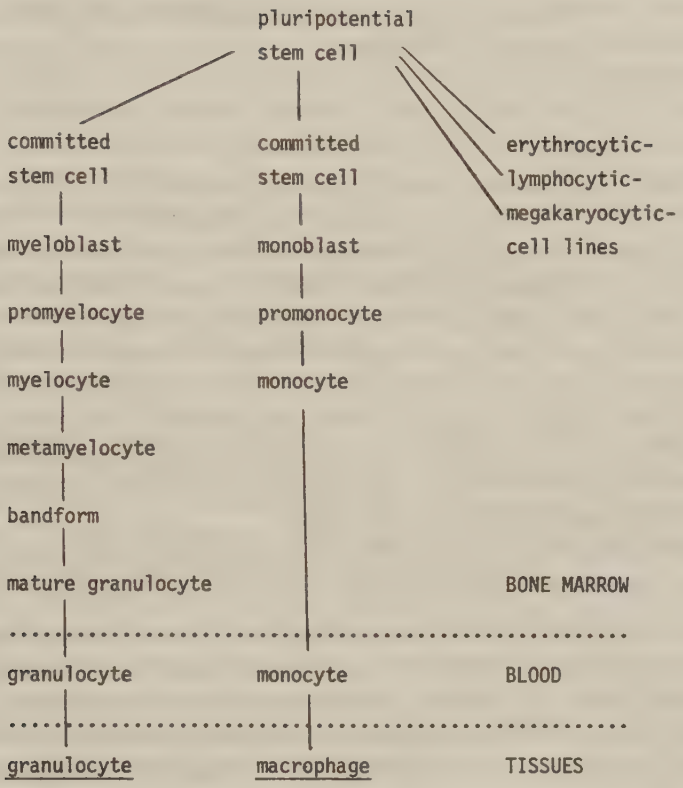

Abb. 9: Die Zellinien, aus denen sich Granulozyten, bzw. Makrophagen entwickeln.
(aus MOVAT: Inflammatory reaction, Fig. 1, S. 180) (43).

THOMASSEN et al. (58) fanden bei Mucoviscidose einen serumabhängigen Phagozytosedefekt dieser Zellen gegenüber Pseudomonas aeruginosa. Andere Bakterien (Staphylokokkus aureus, Staphylokokkus marcescens) wurden normal phagozytiert. Widersprüchlich sind die Angaben über die Phagozytose von Candida albicans durch c.f.-Aleveolarmakrophagen: Bei SORDELLI et al. (56) ergab sich eine erniedrigte Phagozytoserate,

während CASSINO et al. (7) eine vermutlich infektbedingte Steigerung der Phagozytose feststellten.
Die Bedeutung dieser Befunde für die Entstehung einer Infektion hängt vor allem davon ab, wie die Aufgaben zwischen Makrophagen und Granulozyten im Verlauf einer Entzündung verteilt sind.
Unbestritten ist, daß die Alveolarmakrophagen wesentlich an der Aufrechterhaltung steriler Verhältnisse in der Lunge beteiligt sind. Zum einen verfügen die Makrophagen selbst über die Fähigkeit, organische und anorganische Partikel zu beseitigen, zum anderen können sie durch verschiedene Mechanismen spezifische und unspezifische Immunreaktionen in Gang setzen. So trägt auch eine von den Makrophagen produzierte Substanz zur Leukozytenemigration bei und führt gemeinsam mit anderen Faktoren zur Anreicherung der Granulozyten am Ort der Infektion (28). Im weiteren Verlauf übernehmen dann die Granulozyten eine wichtige Funktion, wie schon an deren massenhaftem Erscheinen im Entzündungsgebiet gesehen werden kann.
Granulozyten sind besser als die Makrophagen dazu in der Lage, Fremdkörper selektiv zu erkennen und in großer Zahl zu phagozytieren (43).

Auch die Art der zu bekämpfenden Keime bestimmt die Kompetenzverteilung der phagozytierenden Zellen. Dies geht aus einer Untersuchung von REHM et al. (50) hervor. Tierexperimentell wurde untersucht, welche Zellen für die Abwehr verschiedener Bakterien verantwortlich sind. Dabei zeigte sich, daß Alveolarmakrophagen zwar Staphylokokkus aureus bewältigen können, daß für die Abwehr von Pseudomonas aeruginosa und Klebsiella pneumoniae aber unbedingt Granulozyten gebraucht werden. Dieses Ergebnis ist auch gerade im Blick auf die Infektionen bei Mucoviscidose von Bedeutung bei denen - wie in Kapitel 2.2. ausgeführt - fast immer die beiden Keime Staphylokokkus aureus und Pseudomonas aeruginosa nachgewiesen werden.
Als Konsequenz des Ergebnisses von REHM et al. wäre zu fordern, daß bei Mucoviscidose beide Zellarten - Alveolarmakrophagen und Granulozyten - einen Defekt aufweisen, oder aber - was wahrscheinlicher ist -, daß beide Systeme durch übergeordnete Bedingungen an der Erfüllung ihrer Aufgaben gehindert werden.

6.7. INTRAPULMONALE FAKTOREN BEI MUCOVISCIDOSE UND DEREN MÖGLICHE AUSWIRKUNGEN AUF DIE CHEMOTAXIS DER GRANULOZYTEN

Wie schon in Kapitel 2. beschrieben, ist die Lunge von Mucoviscidoesekranken der Hauptmanifestationsort dieser Krankheit. Die Ätiologie und die Pathogenese der Veränderungen sind unbekannt. Eine Vielzahl von Parametern wird zwar verändert gefunden, aber auch hier ist die Frage nach Ursache und Folge schwer zu beantworten.
Auch immunologische Vorgänge spielen sich in der Lunge unter veränderten Bedingungen ab und werden möglicherweise von diesen an ihrem Ablauf gehindert.

Für diese Arbeit sind vor allem solche veränderten Faktoren von Bedeutung, die die Funktion der Granulozyten beeinträchtigen können. Weil keine eigenen Untersuchungen über die Bedingungen in der Lunge bei Mucoviscidose durchgeführt wurden, soll im Folgenden wieder auf die Ergebnisse anderer Arbeiten zurückgegriffen werden.
Eine der wichtigsten Möglichkeiten, Aussagen über die Verhältnisse in der Lunge zu treffen, ist die schon erwähnte Bronchiallavage. REYNOLDS und NEWBALL (51) bestimmten in der Lavageflüssigkeit die Konzentration verschiedener Proteine und fanden erhöhte Werte des Proteinaseinhibitors α_1-Antitrypsin. In einer Arbeit von PENNINGTON et al. (48) wird ebenfalls von einer Vermehrung des α_1-Antitrypsins berichtet. Zusätzlich fanden diese Autoren noch α_2-Makroglobulin, einem normalerweise im Serum vorkommenden Proteinaseinhibitor. α_1-Antitrypsin und α_2-Makroglobulin haben bei Entzündungsprozessen die Aufgabe, das umgebende Gewebe vor Schaden zu schützen, der durch freiwerdende proteolytische Enzyme entstehen kann. Unter diesem Aspekt ist die Anwesenheit solcher protektiver Stoffe auch in der Lunge von Mucoviscidosekranken "sinnvoll", weil dort fast ständig entzündliche Reaktionen ablaufen und von Entzündungszellen lysosomale Enzyme freigesetzt werden.

Unter einem anderen Aspekt wäre es aber auch denkbar, daß die oben genannten Enzyminhibitoren zum Schaden beitragen, indem sie eine optimale bakterielle Abwehr verhindern.

GOETZL (18) fand heraus, daß die chemotaktische Antwort von Granulozyten auf aktiviertes C_3 oder C_5 nach Vorbehandlung mit α_1-Antitrypsin und auch mit α_2-Makroglobulin gehemmt wurde. Auch WARD und TALAMO (61) fanden Anhaltspunkte, daß α_1-Antitrypsin im Sinne eines "chemotactic factor inhibitors" wirkt.
Bringt man nun die verschiedenen Untersuchungsergebnisse zusammen, dann könnte dies zu folgenden Oberlegungen führen:
Die Granulozyten bei Mucoviscidose sind grundsätzlich in der Lage, bakterielle Infektionen zu erkennen und sich im Entzündungsgebiet anzureichern. Dies gilt auch für die Lunge, wie aus Bronchiallavagen ersichtlich ist. Dort allerdings wird ihr weiteres Vorwärtskommen durch erhöhte Konzentrationen von α_1-Antitrypsin und α_2-Makroglobulin gehemmt, weil diese Stoffe chemotaxisauslösende Stoffe inaktivieren. Dadurch wird einerseits eine ausreichende bakterielle Abwehr unmöglich gemacht, weil die Granulozyten kurz vor ihrem Ziel ihre Bewegung einstellen, andererseits entsteht durch Degranulierung und Freisetzung lysosomaler Enzyme zusätzlicher Gewebeschaden. Als Reaktion darauf werden noch mehr Proteinaseinhibitoren gebildet, ein verhängnisvoller Kreislauf entsteht, der eine ausreichende bakterielle Abwehr unmöglich macht.

Ein ähnlich hypothetisches Modell zur Granulozytenchemotaxis in der Lunge bei Mucoviscidose ergab sich aus folgenden Beobachtungen:
In der Obersicht (Tab. 6), werden die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zur Chemotaxis bei Mucoviscidose wiedergegeben. Nachdem der Einfluß der Patientenwahl schon in Kapitel 6.4.1. diskutiert wurde, soll jetzt die Art der Labormethode betrachtet werden.
Bei den nicht akut infizierten Patienten wurden sowohl normale, als auch signifikant verringerte Werte gefunden. Normale Werte ergaben sich bei der Agarosegelmethode und bei Verwendung eines Filters mit 5 µm Porengröße. Eine signifikant verringerte Chemotaxis wurde in beiden Untersuchungen gefunden, bei denen Filter mit nur 3 µm Porendurchmesser eingesetzt wurden. Normale, reife Granulozyten, die im Blut einen Durchmesser von ca. 10 µm haben, können unter Umständen bis auf einen Durchmesser von 1 µm verformt werden (43).

Aus diesen Ergebnissen könnte gefolgert werden, daß die verringerte Chemotaxis auf eine verminderte Granulozytenverformbarkeit bei Mucoviscidose

zurückzuführen ist, die in vitro dazu führt, daß schon die 3 µm-Poren zu eng sind. Damit könnten einerseits die unterschiedlichen Resultate der angeführten Chemotaxistests bei ähnlicher Patientenwahl erklärt werden, zum anderen müssen auch mögliche Auswirkungen "in vivo" in Betracht gezogen werden.
Denkbar wäre nämlich, daß die verminderte Verformbarkeit die Granulozyten auch im zähen, proteinreichen Schleim der Lunge bei Mucoviscidose am Vorwärtskommen hindert. Auch hieraus ergäbe sich eine Beeinträchtigung der bakteriellen Abwehr und zusätzlicher Gewebeschaden durch die aggressiven lysosomalen Enzyme der Granulozyten.

Zugegebenermaßen lassen diese beiden hypothetischen Modelle noch viele Fragen offen. Sie sollen auch nicht als Lösung des Problems der bakteriellen Infektionen bei Mucoviscidose verstanden werden, sondern auf einige Auffälligkeiten bei der Durchsicht verschiedener Arbeiten hinweisen und mögliche Zusammenhänge zum Krankheitsbild der Mucoviscidose erörtern.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Das Krankheitsbild der Mucoviscidose zeichnet sich unter anderem durch zahlreiche bakterielle Infektionen aus, die fast ausschließlich auf die Lunge beschränkt sind. Besonders auffällig ist das Keimspektrum bei diesen Bronchopneumonien: Fast immer sind Staphylokokkus aureus und Pseudomonas aeruginosa beteiligt. Äußere Faktoren, wie Selektion durch Antibiotika oder häufige Krankenhausaufenthalte bieten keine ausreichende Erklärung, da auch andere Patienten oft unter ähnlichen Bedingungen behandelt werden und trotzdem nicht dieses außergewöhnliche Keimspektrum aufweisen.
Diese Beobachtung legt nahe, daß bei Mucoviscidose auch endogene Faktoren wirksam sind. Solch ein möglicher endogener Faktor könnte auch ein Defekt in der bakteriellen Abwehr sein. Bei verschiedenen anderen Krankheiten, die ebenfalls mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einhergehen, konnte ein Defekt der Granulozytenfunktion nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde die Granulozytenfunktion bei Mucoviscidose untersucht.
Die Untersuchungen wurden an 22 Kindern und Jugendlichen mit Mucoviscidose durchgeführt.
Zur Anwendung kam ein Test, der in vitro die Abtötungsfähigkeit der Granulozyten gegenüber Staphylokokkus aureus und Pseudomonas aeruginosa prüft. In zwei anderen Tests - dem Nitroblautetrazoliumtest und der Chemilumineszenz - wurden Stoffwechselprozesse der Granulozyten untersucht. Der Chemotaxistest erlaubt Aussagen über die Bewegungsfähigkeit der Granulozyten.
Die Untersuchungen ergaben eine normale Abtötungsfähigkeit gegenüber den beiden geprüften Keimen. Auch bei den Versuchen zum Stoffwechsel der Granulozyten fanden sich keine Unregelmäßigkeiten. Bei dem Test zur Bewegungsfähigkeit fand sich allerdings eine signifikant verringerte Chemotaxis.
Es stellt sich die Frage, ob diese verringerte Chemotaxis als primärer Defekt bei Mucoviscidose aufgefaßt werden kann, oder ob z.B. Medikamente, Infekteoder andere Begleitfaktoren zu diesem Ergebnis geführt haben.

Unabhängig davon bietet die defekte Chemotaxis keine ausreichende Erklärung für die strenge Lokalisation der Infektionen auf die Lunge. Sollte ein Granulozytenfunktionsdefekt pathogenetisch eine Rolle spielen, dann nur unter den veränderten Bedingungen der Lunge bei Mucoviscidose.
Aussagen über die Verhältnisse in der Lunge sind durch die Bronchiallavage möglich. Aus solchen Untersuchungen ist bekannt, daß auch in der Lunge von infizierten Mucoviscidosekranken, Granulozyten in grosser Zahl vorkommen, die dort aber offensichtlich keine ausreichende bakterielle Abwehr gewährleisten. Deshalb muß der Einfluß von hemmenden Faktoren in Betracht gezogen werden.

Aus verschiedenen Literaturvergleichen ergaben sich Anhaltspunkte dafür, daß Proteinaseinhibitoren, die in der Lunge von Mucoviscidosekranken vermehrt vorkommen, die Fähigkeit zur Chemotaxis negativ beeinflussen können. Auch eine verminderte Verformbarkeit der Granulozyten könnte im zähen Schleim der Lunge bei Mucoviscidose die Fortbewegung beeinträchtigen und dadurch eine wirksame bakterielle Abwehr verhindern.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. ANDERSEN, D.H.: Cystic fibrosis of the pancreas and its selection to celiac disease; a clinical and pathologc study.
Am. J. Dis. Child. 56, 344, 1938

2. BARBOUR, A.G., ALLRED, C.D., SOLBERG, C.O., HILL, H.R.: Chemiluminscence by polymorphonuclear leucocytes from patients with active bacterial infection.
J. Infect. Dis. 141, 14 - 25, 1980

3. BENNETT, J.V.: Nosocomial infections due to Pseudomonas.
J. Infect. Dis. , Suppl., 130, 4 - 7, 1974

4. BERRY, D.H., BREWSTER, M.A.: Granulocyte NADH-oxydase in cystic fibrosis.
Ann. of Allergy 38, 316 - 319, 1977

5. BÖHME, B.: Phagozytosedefekt der Granulozyten bei zystischer Fibrose.
Helv. Paediat. Acta 27, 607 - 612, 1972

6. BOYDEN, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes.
J. Exp. Med. 115, 453 - 466, 1962

7. CASSINO, R.J.J., SORDELLI, D.O., MACRI, C.N., KOHAN, M., DILLON, M.H., PIVETTA, O.H.: Pulmonary nonspecific mechanisms in cystic fibrosis.
I. Phagocytic capacity of alveolar macrophages and neutrophils.
Ped. Res. 14, 1212 - 1215, 1980

8. CHESON, B.D., CHRISTENSEN, R.L., SPERLING, R., KOHLER, B.E., BABIOR, B.M.: The origin of the chemiluminescence of phagocytising granulocytes.
J. Clin. Invest. 58, 789 - 796, 1976

9. CHURCH, J.A., KEENS, T.G., CHUN-I-WANG, O'NEAL, M., RICHARDS, W.: Normal neutrophil and monocyte chemotaxis in patients with cystic fibrosis.
J. Pediat. 95, 272 - 274, 1979

10. CHURCH, J.A., KEENS, T.G., CHUN-I-WANG: Neutrophil and monocyte chemotaxis in acutely infected patients with cystic fibrosis.
Ann. of Allergy 45, 217 - 219, 1980

11. CLAUSS, G., EBNER, H.: Grundlagen der Statistik,
2. Aufl., 1975, Verlag Harry Deutsch Zürich/Frankfurt a.M.

12. DICKEY, L.B.: Pulmonary disease associated with cystic fibrosis of the pancreas.
Dis. Chest. 17, 151 - 171, 1950

13. DI SANT AGNESE, P.A., PERERA, G.A., SHEA, E.: Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas.
Pediatrics 12, 549, 1953

14. FANCONI, G., UEHLINGER, E., KNAUER, C.: Das Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasen.
Wien.Med. Wschr. 86, 753, 1936

15. FARBER, S.: Pancreatic function and disease in early life.
Arch. Path. 37, 238, 1944

16. FEIGELSON, J., PECAU, Y.: Bacterial studies in bronchial secretions of 19 cases of cystic fibrosis.
Med. Probl. Pediat. 10, 214 - 226, 1967

17. FORSGREN, A., SCHMELLING, D.: Effects of antibiotics on chemotaxis of human leucocytes.
Antimicrob. Agents and Chemotherapy 11, 580, 1977

18. GOETZL, E.J.: Modulation of human neutrophil polymorphonuclear leucocyte migration by human plasma -globulin inhibitors and synthetic esterase inhibitors.
Immunology 29, 163 - 174, 1975

19. GOVAN, J.R.W., FYFE, J.A.M.: Mucoid Pseudomonas aeruginosa and cystic fibrosis: Resistance of the mucoid form to carbenicillin, flucloxacillin and tobramycin and the isolation of mucoid variants in vitro.
J. Antimicrob. Chemother. 4, 233, 1978

20. GRAFT, D.F., MISCHLER, E., FARELL, P.M., BUSSE, W.W.: Granulocyte chemiluminescence in adolescent patients with cystic fibrosis.
Am. Rev. Resp. Dis 125, 540, 1982

21. HAGER-MALECKA, B., SZCZEPANSKI, Z., SYCHLOWY, A., HASNY, E.: Investigations of functions of peripheral blood granulocytes in children with mucoviscidosis.
Ped. Pol. 2, 175 - 178, 1975

22. HILL, H.R., WARWICK, W.J., DETLOFF, J., QUIE, P.: Neutrophil granulocyte function in patients with pulmonary infection.
J. Pediat. 84, 55 - 58, 1974

23. HØIBY,N.: Epidemiological investigations of the respiratory tract bacteriology in patients with cystic fibrosis.
Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect. B 82, 541, 1974a

24. HOLLAND, E.J., LOREN, A.B., SCOTT, P.J., NIWA, Y., YOKOYAMA, M.M.: Demonstration of neutrophil disfunction in the serum of patients with cystic fibrosis.
J. Clin. Lab. Immunol. 6, 137 - 139, 1981

25. HOLMES, B., QUIE, P.G., WINDHORST, D.B., GOOD, R.A.: Fetal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function.
Lancet 1, 1225, 1966

26. HUANG, N.N., VAN COON, E.L., SHENG, K.T.: The flora of the respiratory tract of patients with cystic fibrosis of the pancreas.
Am. J. Dis. Child. 120, 289 - 295, 1970

27. HUNNINGHAKE, G.W., GADEK, J.E., SZAPIEL, S.V., STRUMPF, I.J., KAWANAMI, O., FERRANS, V.J., KEOGH, B.A., CRYSTAL, R.G.: The human alveolar macrophage.
Methods in Cell Biology 21 A, 95 - 112, 1979

28. HUNNINGHAKE, G.W., GADEK, J.E., FALES, H.M., CRYSTAL, R.G.: Human alveolar macrophage-derived chemotactic factor for neutrophils.
J. Clin. Invest. 66, 473 - 483, 1980

29. IACOCCA, V.F., SIBINGA, M.S., BARBERO, G.J.: Respiratory tract bacteriology in cystic fibrosis.
Am. J. Dis. Child. 106, 315 - 324, 1963

30. JAWETZ, MELNICK, ADELBERG:
Medizinische Mikrobiologie, 5. Aufl., 293, 1980
Springer Verlag, Heidelberg

31. KLEBANOFF, S.J., CLARK, R.A.: The neutrophil function and clinical disorders.
North Holland Publishing Comp., Amsterdam/New York/Oxford, 592 - 595, 1978

32. KLEIN, R.B., FISCHER, T.J., GARD, S.E., BIBERSTEIN, M., RICH, K.C., STIEHM, E.R.: Decreased mononuclear and polymorphonuclear chemotaxis in human newborns, infants and young children.
Pediatrics 60, 467 - 472, 1977

33. KULCZICKI, L.L., MURPHY, T.M., BELLANTI, J.A.: Pseudomonas colonisation in cystic fibrosis, a study of 160 patients.
JAMA 240, 30 - 34, 1978

34. LAPP, H., RÜTTGER, P. in Windorfer, A., U. Stephan (Hrsg.): Mucoviscidose. 2. Deutsches Symposion, April 1968, Erlangen, 22 - 29, Georg Thieme Verlag Stuttgart

35. LARAYA-CUASAY, L.R., CUNDY, K.R., HUANG, N.D.: Pseudomonas carrier rates of patients with cystic fibrosis and of members of their families. J. Pediat. 89, 23 - 26, 1976

36. MAASER, R.: Eine Untersuchung gebräuchlicher Länge- und Gewichtstabellen - zugleich ein Vorschlag für ein neues Somatogramm 0 - 14-jähriger Kinder. Mschr. Kinderheilk. 122, 146 - 152, 1974

37. MANCINI, S., PALUMBO, M., BALDUCCI, L., ANTONELLI, M., BARBATO, M.B., BUSINCO, L.: Difetto di funzionalita dei polimorfonucleati nella fibrosi cistica del pancreas. Minerva Pediatrica 28, 1717 - 1718, 1976

38. MANDELL, G.L., HOOD, E.W.: Leukocytic function in chronic granulomatous disease of childhood. Amer. J. Med., 47, 486, 1969

39. MANGOS, J.A., TALAMO, R.C. (Eds.): Cystic fibrosis - Projections into the future. Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, New York, 201 - 203, 1976

40. MAY, J., HERRICK, N.C., THOMPSON, D.: Bacterial Infection in cystic fibrosis Arch. Dis. Child. 47, 908 - 913, 1972

41. McCARTHY, M.M., ROURK, M.H., SPOCK, A.: Bacteremia in patients with cystic fibrosis. Clin. Pediat. 19, 746 - 748, 1980

42. MEARNS, M.B., HUNT, G.H., RUSHWORTH, R.: Bacterial flora of respiratory tract in patients with cystic fibrosis (1950 - 1971). Arch. Dis. Child. 47, 902 - 907, 1972

43. MOVAT, H.Z. (Editor): Current topics in pathology, Vol. 68, Inflammatory reactions. Springer Verlag Berlin/Heidelberg/New York, S. 180, 1979

44. MOVAT, H.Z. (Editor): Current topics in pathology, Vol. 68, Inflammatory reactions. Springer Verlag Berlin/Heidelberg/New York, S. 23, 1979

45. NIETHAMMER, D., WILDFEUER, A., KLEIHAUER, E., HAFERKAMP, C.: Granulozytendysfunktion. I. Angeborene Störungen. Klin. Wschr. 53, 643 - 652, 1975

46. NIETHAMMER, D., WILDFEUER, A., KLEIHAUER, E., HAFERKAMP, O.: Granulozytendysfunktion II. Erworbene Störungen Klin. Wschr. 53, 739 - 746, 1975

47. PARK, B.H., FIKRIG, S.M., SMITHWICK, E.M.: Infection and nitro-blue-tetrazolium reduction by neutrophils. Lancet 2, 532 - 534, 1968

48. PENNINGTON, J.E., WOLFF, S.M., PUZISS, M.: Summary of a work-shop on infections in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 140, 252 - 256, 1979

49. PREISIG, E., HITZIG, W.H.: Nitroblue-tetrazolium test for the detection of chronic granulomatous disease-technical modification. Europ. J. Clin. Invest. 1, 409 - 412, 1971

50. REHM, S.R., GROSS, G.N., PIERCE, A.K.: Early bacterial clearance from murine lungs - species dependent phagocytic response. J. Clin. Invest. 66, 194 - 199, 1980

51. REYNOLDS, H.Y., NEWBALL, H.H. in Kirkpatrick, C.H., Reynolds, H.Y. (Editors): Immunologic and infectious reactions in the lung. Marcel Dekker Inc., New York/Basel, 17 - 19, 1976

52. REYNOLDS, H.Y., LEVINE, A.S., WOOD, R.E., ZIERDT, C.H., DALE, D.C., PENNINGTON, J.E.: Pseudomonas aeruginosa infections: Persisting problems and current research to find new therapies. Ann. Intern. Med. 82, 819 - 831, 1975a

53. ROE, E.A., JONES, R.J.: Intracellular killing of different strains of Pseudomonas aeruginosa by human leucocytes. Brit. J. Exp. Pathol. 55, 336 - 343, 1974

54. SCHOPFER, K., DOUGLAS, S.D.: Neutrophil function in children with kwashiokor. J. Lab. Clin. Med. 88m 450 - 461, 1976

55. SCHWARZMANN, S., BORING, J.R.: Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 3, 762 - 767, 1971

56. SORDELLI, D.O., CASSINO, R.J., MACRI, C.N., KOHAN, M., DILLON, M.H., PIVETTA, O.H.: Phagocytosis of Candida albicans by alveolar macrophages from patients with cystic fibrosis. Clinical Immunology and Immunopathology 22, 153 - 158, 1982

57. SULLIVAN, J.F., DOLAN, T.F., MEYERS, A., TREAT, K.: Use of the nitro-blue-tetrazolium test - an aid in managing patients with cystic vibrosis. Am. J. Dis. Child. 125, 702 - 704, 1973

58. THOMASSEN, M.J., BOXERBAUM, B., DEMKO, C.A., KUCHENBROD, P.J., DEARBORN, D.G., WOOD, R.E.: Inhibitory effect of cystic fibrosis serum on Pseudomonas phagocytosis by rabbit and human alveolar macrophages.
Ped. Res. 13, 1085 - 1088, 1979

59. VAN DYKE, K., TRUSCH, M., WILSON, M., STEALEY, P., MILES, A.: Luminol dependent chemiluminescence, analysis of cellular and humoral defects of phagocytosis with a Chemo-GLO photometer.
Microchem. J. 22, 463, 1977

60. WARD, P.A.: Chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes.
Biochem. Pharm. Suppl. 99, 105, 1968

61. WARD, P.A., TALAMO, R.C.: Deficiency of the chemotactic inactivator in human sera with α_1-anti-trypsin deficiency.
J. Clin. Invest. 52, 516 - 519, 1973

62. WOOD, R.E.: Pseudomonas: The compromised host.
Hospital Practice, Aug. 1976, 91 - 100

63. WOOD, R.E., BOAT, T.F., DOERSHUK, C.F.: Cystic fibrosis
Amer. Rev.Res.Dis. 113, 833-878, 1976

64. ZIELINSKI, C.C., GÖTZ, M., AHMAD, R., EIBL, M.M.: Defective leucocyte locomotion in cystic fibrosis.
N.Engl.J.Med. 306, Nr. 8, 486-487, 1982

- L e b e n s l a u f -

	Helmut Horst Kachler
am 26. 3.1957	geboren in Ludwigsburg als Sohn des Hermann Kachler und der Elisabeth Kachler geb. Hörmann
1964	Einschulung an der Grundschule in Asperg
1968	Wechsel an das Friedrich-List-Gymnasium Asperg
1977	Abitur
1977-1979	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz im Kreisverein Ludwigsburg
3/1979	Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Tübingen
1981	Physikum
1982	1. Staatsexamen
3/1984	2. Staatsexamen
1984	4 monatiger Auslandsaufenthalt mit medizinischen Praktika in Cali/Kolumbien und Lima/Peru
10/1984	Beginn des Praktischen Jahres in Esslingen
am 14.11.1985	den 3. Teil der ärztlichen Prüfung bestanden
12/1985	Erteilung der Approbation
seit 4/1986	Assistenzarzt an der Inneren Abteilung am Städtischen Krankenhaus in Esslingen

Druck und Gesamtherstellung: Druckerei Bölk, Tübingen